

VALÉRIA GIGLIO TOGNI

EFEITO DA SALINIDADE SOBRE A RESPOSTA DO SISTEMA ANTIOXIDANTE E
EXPRESSÃO DE HSP70 EM SIRIS (GÊNERO *CALLINECTES*)

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Área de Concentração em Fisiologia, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular e Molecular

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Carolina Arruda de Oliveira Freire

Co-orientador: Prof. Dr. Silvio Marques Zanata

CURITIBA

2007

VALÉRIA GIGLIO TOGNI

EFEITO DA SALINIDADE SOBRE A RESPOSTA DO SISTEMA ANTIOXIDANTE E
EXPRESSÃO DE HSP70 EM SIRIS (GÊNERO *CALLINECTES*)

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Área de Concentração em Fisiologia, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular e Molecular

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Carolina Arruda de Oliveira Freire

Co-orientador: Prof. Dr. Silvio Marques Zanata

CURITIBA

2007

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof^a Dr^a Carolina Arruda de Oliveira Freire pela coragem de aceitar o desafio deste trabalho, pelo exemplo profissional, compreensão e pela confiança em mim depositada.

Ao Prof. Dr. Marcelo Hermes Lima pela contribuição intelectual, oportunidade, pela colaboração no desenvolvimento da metodologia do estresse oxidativo, e pela doação de todos os reagentes necessários para o início das dosagens.

Ao Dr Luciano Cardoso, orientado do Prof. Hermes-Lima na UNB, pela paciência, hospitalidade e, principalmente pela atenção durante o aprendizado de técnicas utilizadas neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Silvio Marques Zanata e a Viviane Swanoi pelo colaboração na realização das técnicas de imunodeteção.

Ao Prof. Dr. Estênio Perdigão Fragoso pela enorme paciência, colaboração, pelas horas no laboratório e pela persistência na busca infrutífera de resultados no projeto de tese que antecedeu este projeto.

Ao Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga por ter aceito colaborar com o projeto original, que terminou não sendo executado como planejado.

Ao Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes por sempre disponibilizar aparelhos e reagentes de seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Adalto Bianchini por compartilhar sua experiência no estudo de crustáceos.

A Cassiana Baptista Metri pela ajuda na identificação dos animais.

Ao CNPq pela bolsa de estudos a mim concedida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

Ao meu marido Cezar Luiz de Carvalho e aos colegas de laboratório.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iv
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	vi
RESUMO GERAL.....	viii
ABSTRAT.....	viii
INTRODUÇÃO GERAL.....	01
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	09
 CAPÍTULO 1: ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR EXPOSIÇÃO AO AR E A VARIAÇÃO DE SALINIDADE EM SIRIS <i>Callinectes danae</i> e <i>Callinectes ornatus</i>	 16
 CAPÍTULO 2: ESTRESSE SALINO OU TÉRMICO DE CURTA DURAÇÃO NÃO INDUZ A EXPRESSÃO DE HSP70 EM MÚSCULO DOS SIRIS <i>Callinectes danae</i> e <i>Callinectes ornatus</i>	 53
 CONCLUSÕES GERAIS.....	 66

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1: Fotografia de <i>Callinectes danae</i>	07
Figura 2: Fotografia de <i>Callinectes ornatus</i>	07

CAPÍTULO 1

Figura 1.1. Osmolalidade da hemolinfa.....	31
Figura 1.2. Estresse de Oxigênio. Atividade de glutathione peroxidase	32
Figura 1.3. Estresse salino. Atividade de glutathione peroxidase	33
Figura 1.4. Estresse de oxigênio. Atividade da Catalase	34
Figura 1.5. Estresse salino. Atividade da Catalase.....	35
Figura 1.6. Estresse de oxigênio. Atividade da Glutathione S-Transferase	36
Figura 1.7. Estresse salino. Atividade da Glutathione S-Transferase.....	37
Figura 1.8. Estresse de Oxigênio. Níveis de Proteínas Carboniladas	38
Figura 1.9. Estresse salino. Níveis de Proteínas Carboniladas	39
Figura 1.10. Estresse de oxigênio. Níveis de Peroxidação lipídica (TBARS).....	40
Figura 1.11. Estresse salino. Níveis de Peroxidação lipídica (TBARS)	41
Tabela 1.1. Valores de atividade específica constitutiva da enzima.....	48

CAPÍTULO 2

Figura 2.1. Densidade das bandas de Hsp70 expressa no músculo de <i>Callinectes danae</i>	59
Figura 2.2. Densidade das bandas de Hsp70 expressa no músculo de <i>Callinectes ornatus</i>	60

RESUMO GERAL

O ambiente marinho costeiro abriga grande diversidade de crustáceos decápodos. Braquiúros tais como *Callinectes danae* e *Callinectes ornatus* habitam desde a região entre-marés até várias dezenas de metros de profundidade e são bastante tolerantes à variação de salinidade, de temperatura e de oxigênio dissolvido. *Callinectes danae* apresenta, contudo ciclo de vida dependente da variação de salinidade, habitando estuário (baixa salinidade) até o momento da reprodução quando as fêmeas ovígeras migram para áreas de maior profundidade e salinidade, o mesmo não tendo sido relatado para *C. ornatus*. Neste trabalho foi avaliada a resposta do sistema antioxidante de ambas as espécies à variação de salinidade, para preencher lacuna na literatura, que tem privilegiado a variação no oxigênio dissolvido e até na temperatura como agentes estressantes em animais marinhos, os quais foram utilizados neste trabalho como situações controle. Foi ainda verificada a hipótese de que estas espécies congêneras de siris, mas com ciclos de vida ligeiramente diferentes, apresentariam diferentes respostas de expressão das proteínas de estresse (Hsp70) durante estresse térmico e salino de curta duração, simulando o que ocorreria nos ambientes de região influenciada pelas marés. Foram determinadas as atividades de glutathione peroxidase (GPX), catalase e glutathione-S-transferase (GST), assim como níveis de proteínas carboniladas e peroxidação lipídica em hepatopâncreas, brânquias (anterior e posterior) e músculo de *Callinectes danae* e *Callinectes ornatus* diante de estresse hipersalino (40‰) e hiposalino (10‰), além da exposição ao ar. Foi detectada e quantificada a expressão de Hsp70 no tecido muscular das duas espécies de siris submetidos ao aumento de temperatura de 10°C e ao estresse hiper (40‰) e hiposalino (10‰) por 2 horas. A espécie dependente da variação de salinidade para as diferentes fases

do ciclo de vida (*Callinectes danae*), apresentou alta atividade de GPX e catalase constitutivamente, principalmente em hepatopâncreas e músculo, quando comparados aos animais do grupo controle da espécie que não é dependente das variações de salinidade (*Callinectes ornatus*). Este fato parece influenciar a atividade dessas enzimas durante as situações de estresse, pois não ocorreu aumento da atividade de GPX e catalase em *C. danae*, como ocorreu em *C. ornatus*. GST não mostrou resposta significativa aos estresses apresentados, fortalecendo o conceito de seu maior envolvimento diante de estresse químico. Os resultados mostraram ainda que a salinidade foi importante indutor da atividade de GPX e catalase e que *Callinectes danae* e *Callinectes ornatus* apresentaram mecanismos distintos de modulação da atividade de estas enzimas, suficientes para evitar danos oxidativos a lipídios e proteínas durante o estresse de oxigênio e o estresse salino. Contudo, nossos resultados sugerem que os ciclos curtos de variação de temperatura ou salinidade não foram suficientes para induzir a expressão de Hsp70 em músculo destes animais.

ABSTRACT

The marine coastal environment is home to a great diversity of decapod crustaceans. Brachyurans such as *Callinectes danae* and *Callinectes ornatus* occupy regions from the intertidal zone down to several dozen meters of depth, and are very tolerant to variation in salinity, temperature, and dissolved oxygen. *Callinectes danae* has a life cycle dependent on salinity variation for its completion. It inhabits the estuary (low salinity) until time of reproduction, when ovigerous females migrate to deeper and more saline areas. This same habit has not been reported for *C. ornatus*. In this study the response of the antioxidant system of both species to salinity variation has been evaluated, in order to fill a gap in the literature, which has privileged variation in

dissolved oxygen and increases in temperature as stressful agents to marine organisms. An additional hypothesis has also been tested: that these 2 congeneric species of crabs with slightly different life cycles would display different patterns of response of the expression of heat-shock proteins (Hsp70) when facing thermal and saline stresses of short duration, simulating what would occur in areas under tidal influence. The activities of GPX, catalase and GST, as well as the levels of carbonyl proteins and lipid peroxidation have been assayed in hepatopancreas, gills (anterior and posterior) and muscle of *Callinectes danae* and *Callinectes ornatus*, after exposure to hypersaline (40‰) or hyposaline (10‰) seawater, or to the air (3 h). The expression of Hsp70 was detected and quantified through immunoblotting in muscle tissue of both species submitted to a 10°C increase in temperature, and to hyper- (40‰) and hyposaline (10‰) stress (2 h). The species that spends part of its life cycle in the estuary (*Callinectes danae*), displayed high constitutive activity of GPX and catalase, mainly in hepatopancreas and muscle, when compared to its congener *Callinectes ornatus*. In accordance, there was no increase in GPX and catalase activities in *C. danae* upon the stresses applied, such as happened to *C. ornatus*. GST did not show a clear pattern of response to the stresses imposed, strengthening its more frequently reported role in the detoxification of contaminants. Results also showed that salinity (increase) was an important inducer of activity of GPX and catalase in *Callinectes ornatus*, and that both species displayed distinct patterns of response to oxidative stress, both sufficient to prevent oxidative damage to proteins and lipids during oxygen and saline stress. In conclusion, the results suggested that short periods of temperature and salinity variation were not sufficient to induce the expression of Hsp70 in the muscle of these crabs.

INTRODUÇÃO GERAL

Definidos como quaisquer átomos ou moléculas que possuam elétrons não pareados e que têm existência independente, os radicais livres vêm sendo amplamente utilizados na indústria desde meados do século XX. Contudo, existiam ainda poucas evidências dos efeitos dos radicais livres nos organismos vivos. Atualmente, há evidências do envolvimento de radicais livres em diversos processos fisiológicos e patológicos (VALKO *et al.*, 2007; MISHRA, 2007). Danos oxidativos induzidos por radicais livres ocorrem por um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, fato que caracteriza o estresse oxidativo (AHMAD, 1995; HERMES-LIMA, 2004; MISHRA, 2007).

Devido ao metabolismo celular aeróbico, os radicais de oxigênio e espécies relacionadas são as mais abundantes formas de radicais livres nos seres vivos. O termo espécie reativa de oxigênio ("reactive oxygen species", ROS), é utilizado tanto para espécies reativas de oxigênio, tais como superóxido (O_2^-) e hidroxila ($^{\bullet}OH$), como também para as formas reativas de nitrogênio (RNS), como por exemplo óxido nítrico ($^{\bullet}NO$) e dióxido de nitrogênio ($^{\bullet}NO_2$). O ânion superóxido (O_2^-), cuja formação está ligada à cadeia respiratória mitocondrial e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), formado durante a dismutação do O_2^- , têm baixa toxicidade, contudo podem ser convertidos em radicais livres altamente tóxicos, como o radical hidroxil ($^{\bullet}OH$) que pode danificar macromoléculas como DNA, lipídios e proteínas (JANERO *et al.*, 1991; CADENAS, 1995; DE ZWART *et al.*, 1999; HERMES-LIMA *et al.*, 2001; HERMES-LIMA, 2004).

A linha de defesa antioxidante primária nos organismos aeróbicos é constituída pelos antioxidantes de natureza não enzimática, cuja maioria provém da dieta animal, como a vitamina E e carotenóides e pelos antioxidantes de natureza enzimática, cujos principais representantes são a glutathione peroxidase dependente de selênio (Se-

GPX), a catalase (CAT), a glutathione S-transferase (GST) e todas as isoformas de superóxido dismutases (Mn-SOD, isoforma mitocondrial; CuZn-SOD, isoforma citosólica; Fe-SOD, isoforma bacteriana) (HERMES-LIMA, 2004). A catalase é uma enzima peroxissomal que converte o H_2O_2 em $2\text{H}_2\text{O}$ e O_2 quando este se acumula na célula (ALBERTS et al., 1997). A Se-GPX também catalisa a decomposição de H_2O_2 e ainda de peróxidos orgânicos, contudo requer GSH como co-substrato. Todas as isoformas de SOD catalisam a dismutação de O_2^- em H_2O_2 e O_2 . A GST tem atividade antioxidante ao auxiliar a atividade de Se-GPX junto a peróxidos orgânicos e ao catalisar a conjugação de xenobióticos a GSH (AHMAD, 1995; FRIDOVICH, 1998; HERMES-LIMA et al., 1998).

Danos oxidativos podem ocorrer quando a produção de radicais livres excede a capacidade do sistema antioxidante ou quando o estresse provoca a redução da capacidade antioxidante do sistema, o que tem sido relacionado a diversas doenças como, diabetes, hipertensão e câncer (BAINES, 2002). O sistema antioxidante animal pode ser modulado durante o estresse oxidativo, contudo a capacidade modulatória não é padronizada, sendo estresse, tecido e espécie-específica. (CRAWFORD et al., 2000). Vários estudos têm considerado como modelo animais com grande potencial para estresse oxidativo, para evidenciar adaptações do sistema antioxidante que permitam a estes animais sobreviver a situações que causariam sérios danos para a maioria dos mamíferos. Durante grandes períodos de privação de oxigênio, a rã leopardo (*Rana pipiens*), a “garter snake” (*Thamnophis sirtalis parietalis*) e caracóis terrestres (*Helix aspersa*) aumentam sua capacidade antioxidante aumentando a atividade das enzimas antioxidantes, como preparo para o potencialmente nocivo estresse da reperfusão (HERMES-LIMA AND STOREY, 1993; 1995, 1996). Na tartaruga de água doce (*Trachemys scripta elegans*), o que ocorre é a manutenção de alta atividade constitutiva das enzimas antioxidantes que permite ao animal lidar com

o estresse oxidativo que surge durante a reoxigenação após o período de baixíssimo metabolismo embaixo da água (HERMES-LIMA *et al.*, 1998, 2001). Por outro lado, no peixe dourado ambos os mecanismos estão presentes, além da “up-regulation” existe ainda alta atividade constitutiva de enzimas antioxidantes, permitindo a notável tolerância a exposição ao ar nestes animais (HERMES-LIMA AND ZENTENO-SAVÍN, 2002; LUSHCHAK *et al.*, 2002).

O estuário é uma massa de água costeira que possui ligação com o mar aberto que, influenciado pelos movimentos das marés, apresenta mistura da água doce com a água do mar em proporções variadas durante o dia, resultando em flutuação de salinidade. O ambiente estuarino poderia ser considerado apenas como uma área de transição entre o ambiente marinho e o de água doce, porém suas características ecológicas o tornam um ecossistema diferenciado, abrigando intensa atividade reprodutiva de inúmeras espécies de moluscos, crustáceos e peixes, que encontram nos estuários proteção contra predadores e alimento abundante para um crescimento rápido (ODUM, 1988). Estudo com peixes estuarinos mostrou que a atividade das principais enzimas antioxidantes foi maior em estuários que apresentavam maior amplitude de variação média no oxigênio dissolvido (ROSS *et al.*, 2001). A relação direta entre o estresse salino e o aumento na produção de ROS foi observada em medula renal de ratos quando alterações na concentração de solutos, principalmente Na^+ , induziram o estresse oxidativo (MORI *et al.*, 2004). Assim, animais estuarinos tornam-se importantes modelos de estudo dos efeitos da variação das condições ambientais, principalmente salinidade, nos mecanismos de resposta do sistema antioxidante. A literatura carecia de estudos relacionando o estresse oxidativo em animais marinhos com a variação na salinidade.

A resposta ao estresse ou resposta de choque térmico é um mecanismo molecular, altamente conservado, utilizado pelos organismos para compensar as

perturbações da função celular induzidas pelas variações do meio (FEDER, 1995; YENARI *et al.*, 1999). Calor e vários outros tipos de estresses induzem a expressão de um conjunto de proteínas que mantêm a integridade e viabilidade celular (YENARI *et al.*, 1999). Originalmente induzida pelo choque térmico, a resposta das proteínas de estresse foi denominada resposta das proteínas de choque térmico ("heat shock proteins", Hsps). Contudo, mudanças de pH, isquemia, hipóxia, agentes tóxicos, osmolaridade extrema, infecções, inflamações e vários outros estímulos podem induzir a expressão das Hsps (FEDER, 1995).

A maioria das proteínas de estresse pertence às famílias de proteínas grandes de até 100 kDa (Hsp100, Hsp90, Hsp70 e Hsp60), as quais são altamente conservadas entre as espécies (BECKER & CRAIG, 1994; LINDQUIST & CRAIG, 1988; FEDER, 1995 ; YENARI, *et al.*, 1999). A Hsp70 humana por exemplo, apresenta 73% de homologia com a Hsp70 da *Drosophila* e 50% com a da *E. coli* (FEDER, 1995). Alguns membros dessas famílias são expressos constitutivamente, sendo conhecidas como "heat shock cognates" (Hscs) e têm funções básicas no metabolismo celular (BECKER & CRAIG, 1994; YENARI, *et al.*, 1999). As Hsps estão ainda envolvidas em muitos processos essenciais para a função celular em condições fisiológicas tais como, apresentação de antígeno, função de receptor de esteróides, tráfego intracelular, ligação de receptor nuclear e apoptose (GRIGORE & INDREI, 2001; YENARI *et al.*, 1999). Contudo, é na biossíntese de proteínas que desempenham sua função mais importante, agindo como "chaperones" moleculares (chaperoninas), auxiliando polipeptídeos nascentes a assumirem sua conformação tridimensional correta (BECKER & CRAIG, 1994; CRAIG, 1985; FEDER, 1995; FEDER & HOFMANN, 1999; ZHANG *et al.*, 2002). Da mesma forma, as Hsps protegem as células da desnaturação e agregação de polipeptídios induzidos durante o estresse, aumentando as chances de sobrevivência da célula (BECKER & CRAIG,

1994; LINDQUIST & CRAIG, 1988; FEDER, 1995; YENARI, *et al.*, 1999). As "heat shock proteins" de 70kDa (Hsp70 ou Hsp72) são uma abundante classe de chaperones moleculares (LOPEZ-BUESA *et al.*, 1998), e seu papel protetor diante da apoptose induzida por estresse têm sido demonstrado (MOSSER, *et al.*, 1997; BUZZARD, *et al.*, 1998). Outros estudos mostraram haver uma relação direta entre a resistência à injúria, observada em certas populações de neurônios, e a expressão de Hsp70 nestas células (SHARP *et al.*, 1995; 1999). De fato, o tratamento com Hsps exógenas tem sido sugerido como forma de proteção neuronal quando administrado imediatamente pós-insulto (DIAMANT *et al.*, 2001; YENARI *et al.*, 1999)

A observação de que o aumento de temperatura induzia a ativação transcricional em determinadas regiões dos cromossomos gigantes ("puffing" em cromossomos politênicos) de *Drosophila* (RITOSSA, 1962) impulsionou a exploração do mecanismo da tolerância induzida ao estresse ou termotolerância (BECKER & CRAIG, 1994; FEDER, 1995). Segundo este fenômeno, um primeiro estresse subletal torna a célula tolerante a um subsequente estresse extremo (BECKER & CRAIG, 1994; FEDER, 1995; LINDQUIST, 1986; SANCHEZ & LINDQUIST, 1990; YENARI *et al.*, 1999. A deleção do gene de Hsp104 e de Hsp70 em levedura mostrou que as proteínas de estresse não só estão relacionadas com termotolerância, como são essenciais para o fenômeno (CRAIG & JACOBSEN, 1984).

O potencial mecanismo de proteção da Hsp70 também parece ter papel importante contra os danos causados pelo estresse oxidativo. Em cultura de células da glia de camundongos, a habilidade de Hsp 70 em proteger contra a exposição ao peróxido de hidrogênio foi associada ao aumento dos níveis de glutathione, sugerindo que Hsp70 poderia proteger as células através de um mecanismo antioxidante (YENARY *et al.*, 1999). Observações feitas em ratos após isquemia cerebral sugerem que a expressão prolongada de Hsp70 potencializa o efeito protetor da SOD através

da sua função de chaperonina. A Hsp70 parece ter ainda efeito inibidor sobre a enzima óxido nítrico sintetase, atenuando o estresse oxidativo produzido durante a inflamação e isquemia (YENARY *et al.*, 1999).

O estudo do papel das Hsps na fisiologia do estresse tem mostrado que todas as espécies têm os genes que codificam para as Hsps, contudo o padrão de expressão desses genes varia com o nível de estresse do ambiente (ambiente-dependente), sendo que a expressão das Hsps, principalmente Hsp 70, tem sido utilizada como um marcador de estresse (YENARY *et al.*, 1999). Provavelmente, espécies que apresentam maiores níveis de expressão das proteínas de estresse estão submetidas, naturalmente, a condições ambientais mais variáveis, o que pode torná-las mais resistentes ao estresse (FEDER & HOFMANN, 1999). Dessa maneira, animais estuarinos, ou que permanecem parte do ciclo de vida no estuário, poderiam ser mais resistentes devido aos maiores níveis de expressão das proteínas de estresse. Por outro lado, a habilidade de aumentar os níveis celulares de Hsp70 em resposta ao choque térmico foi prejudicada em moluscos coletados em regiões de baixa salinidade (WERNER, 2004). Assim, para a utilização de Hsp70 como indicador de estresse, é necessário expandir o conhecimento sobre a influencia de fatores ambientais naturais como temperatura e salinidade, sobre a expressão desta proteína.

Callinectes sapidus, *Callinectes danae*, Smith, 1869 e *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 são espécies de braquiúros (carangueijos e siris) bastante tolerantes à variação de salinidade que se destacam pela abundância em todo litoral sul e sudeste do Brasil (BAPTISTA *et.al.*, 2003). *Callinectes danae* (Fig. 1) é registrado da região entre-marés até mar aberto (75 m de profundidade), contudo ocupam áreas estuarinas durante parte da vida. Habita regiões de salinidade variável (estuário) durante o seu desenvolvimento e crescimento da fase juvenil até a fase adulta

quando migra para mar aberto para a desova e incubação dos ovos, os quais necessitam de ambiente de salinidade estável (BRANCO AND MANSUNARI, 2000; CHACUR *et al.*, 2000; PAUL, 1982 apud CHACUR *et al.*, 2000; MELO 1999). De fato; *Callinectes danae* mostrou ser a espécie numericamente dominante no complexo estuarino de Santos (SP), contribuindo com mais de 92% do total dos animais coletados (PITA *et al.*, 1985). Por outro lado, estudo recente realizado na região sudeste do Brasil mostrou o predomínio de *C. ornatus* (Fig. 2) a partir de 25 m de profundidade (BRAGA *et al.*, 2005), corroborando com o levantamento faunístico da região que não evidenciou *C. ornatus* procedentes do estuário (PITA *et al.*, 1985). Ainda, a ocorrência de formas juvenis na baía, durante o ano todo sugere que *C. ornatus* aparentemente não apresenta o mesmo mecanismo de migração estuário-baía-mar aberto observado durante a reprodução de *C. danae* (NEGREIROS-FRANSOZO AND FRANSOZO, 1995).



Figura 1: Exemplar adulto de *Callinectes danae*.



Figura 2: Exemplar adulto de *Callinectes ornatus*.

Poucos estudos têm investigado as estratégias adotadas pelos crustáceos estuarinos para reduzir danos oxidativos ocasionados pelo seu habitat natural. Foi demonstrado que caranguejos estuarinos (*Chasmagnathus granulatus*) apresentaram estratégia preparatória para o estresse oxidativo durante os períodos de exposição ao ar e reoxigenação impostos pelo ambiente estuarino (OLIVEIRA *et al.*, 2004). Assim, outros fatores ambientais como a salinidade, podem ser fatores decisivos no desenvolvimento de estratégias para evitar danos oxidativos e garantir a sobrevivência de espécies de siris que vivem dentro e fora do estuário durante seu ciclo de vida. Elucidar tais mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo em siris, cujo ciclo de vida os obriga a experimentar condições ambientais adversas, poderia ser útil para o entendimento e intervenção em situações que para outros animais seriam letais.

A hipótese testada por este estudo foi a de que duas espécies interespecíficas congênicas de siris, mas com ciclos de vida ligeiramente diferentes, apresentariam respostas distintas do sistema antioxidante e das proteínas de estresse (Hsp70) durante diferentes tipos de estresse semelhantes aos que ocorrem no seu habitat natural.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, S. Antioxidant mechanisms of enzymes and proteins. In: Oxidative and Antioxidant Defenses in Biology (**Ahmad,S., Ed**), **Chapman & Hall, New York**, 238-72, 1995.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia Molecular da Célula**. Artes Médicas, Porto Alegre, pp. 574, 1997.
- BAINES, A; HO, P. Glucose stimulates O₂ consumption NOS, and Na/H exchange in diabetic rat proximal tubules. **Am. J. Physiol.** **283**: F286-93, 2002.
- BAPTISTA, C.; PINHEIRO, M. A. A.; BLANKENSTEYN, A.; BORZONE, C. A. Estrutura populacional de *Callinectes ornatus* Ordway (Crustacea, Portunidae) no Balneário de Shangri-lá, Pontal do Paraná, Paraná, Brasil. **Res. Bras. Zool.** **20**: 661-66, 2003.
- BRAGA, A.; FRANSOZO, A.; BERTINI, G. Composição e abundância dos carangueijos (Decapoda, Brachyura) nas regiões de Ubatuba e Caraguatatuba, litoral norte paulista, Brasil. **Biota Neotrop.** **5**:45-78, 2005.
- BRANCO, J. O.; MANSUNARI, S. Reproductive ecology of blue crab, *Callinectes danae* Smith, 1869 in the Conceição lagoon system, Santa Catarina Isle, Brazil. **Rev. Bras. Biol.** **60**: 17-27, 2000.

BECKER, J. and CRAIG, E. A. Heat-shock proteins as chaperones. **Eur. J. Biochem.** **219**:11-23, 1994.

BUZZARD, K. A.; GIACCIA, A. J.; KILLENDER, M.; ANDERSON, R. L. Heat shock protein 72 modulates pathways of stress-induced apoptosis. **J. Biol. Chem.** **237**:17147-153, 1998.

CHACUR , M. M.; MANSUR, C. B.; NEGREIROS-FRANSOZO, M. L. Distribution patterns, seasonal abundance and moult cycle of *Callinectes danae* Smith, 1869 in Ubatuba region, Brazil. **Nauplius** **8**: 215-26, 2000.

CADENAS, E. Mechanism of oxigen activation and reactive oxigen species detoxification. In: Oxidative estress and Antioxidant Defenses in Biology (Ahmad,S., Ed), Chapman & Hall, New York, 1-61, 1995.

CRAIG, E. A. The heat shock response. **CRC Crit. Rev. Biochem.** **18**: 239-80, 1985.

CRAIG, E. A. and JACOBSEN, K. Mutations of the heat inducible 70 kilodalton genes of yeast confer temperature sensitive growth. **Cell** **38**: 841-49, 1984.

CRAWFORD, D. R.; SUZUKI, T.; DAVIES, K. J. A. Redox regulation of gene expression. In: **Antioxidant and redox regulation of gene.** (Sen, C. K., Sies, H., & Baeuerle P. A. Eds), 21-45. Academic Press, San Diego, 2000.

DE ZWART, L. L.; MEERMAN, J. H. N.; COMMANDEUR, J. N. M. AND VERMEULEN, N. P. E. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. **Free Radic. Biol. Med.** **26**: 202-26, 1999.

DIAMANT, S.; ELIAHU, N.; ROSENTHAL, D. and GOLOUBINOFF, P. Chemical Chaperones Regulate Molecular Chaperones in vitro and in Cells under Combined Salt and Heat Stress. **J. Biol. Chem.** **276**: 39586-91, 2001.

FEDER, E. M. and HOFMANN, G. E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annu. Rev. Physiol.** **61**: 243-82, 1999.

FEDER, E. M.; PARSELL, A. D. and LINDQUIST, S. The stress response and stress proteins. In: **Cell Biology of Trauma**. (Lemasters, J. J. & Oliver, C. Eds), CRC Press. Boca Raton; 177-191, 1995.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **J. Exp. Biol.** **201**: 1203-09, 1998.

GRIGORE, M.; INDREI, A. The role of heat shock proteins in reproduction. **Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi** **105**: 674-6, 2001.

HERMES-LIMA, M. **Functional metabolism: Regulation and Adaptation**, (Storey, K. B. Ed), John Wiley & Sons, Inc. 320-68, 2004.

HERMES-LIMA, M.; STOREY, K. B. Role of antioxidants in the tolerance of freezing and anoxia by garter snakes. **Am. J. Physiol.** **265**: R646-52, 1993.

HERMES-LIMA, M.; STOREY, K. B. Antioxidant defenses and metabolic depression in a pulmonate land snail. **Am. J. Physiol.** **268**: R1386-93, 1995.

HERMES-LIMA, M.; STOREY, K. B. Relationship between anoxia exposure and antioxidant status in frog *Rana pipiens*. **Am. J. Physiol.** **271**: R918-25, 1996.

HERMES-LIMA, M.; STOREY, J. M.; STOREY, K. B. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. **Comp. Biochem. Physiol. B** **120**: 437-48, 1998.

HERMES-LIMA, M.; STOREY, J. M.; STOREY, K. B. Antioxidant defenses and animal adaptation to oxygen availability during environmental stress. **Cell. Mol. Resp. Stress** **2**: 263-87, 2001.

HERMES-LIMA AND ZENTENO-SAVÍN. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. **Comp. Biochem. Physiol. C** **133**: 537-56, 2002.

JANERO, D. R, HRENIUK, D. AND SHARIF, H. M. (1991). Hydrogen peroxide-induced oxidative stress to the mammalian heart-muscle cell (cardiomyocyte): Lethal peroxidative injury. **J. Cell. Physiol** **149**: 347-64.

LINDQUIST, S AND CRAIG, E. A. The heat-shock proteins. **Annu. Rev. Genet.** **22**: 631-77, 1988.

LINDQUIST, S. The heat-shock response. **Annu. Rev. Biochem.** **55**: 1151-91, 1986.

LOPEZ-BUESA, P.; PFOND, C. and CRAIG, E. A. The biochemical properties of the ATPase activity (Hsp70) are governed by the C-terminal domains. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **95**:15253-258, 1998. LAEMMLI *et al.*, 1970

LUSHCHAK, V. L.; LUSHCHAK, L. P.; MOTA, A. A.; HERMES-LIMA, M. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. **Am. J. Physiol.** **280**: R100-07, 2001.

NEGREIROS-FRANSOZO, M. L.; FRANSOZO, A. On the distribution of *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 and *Callinectes danae* Smith, 1869 (Brachyura, Portunidae) in the Fortaleza Bay, Ubatuba, Brazil. **Iheringia, Sér. Zool.** **79**: 3-12, 1995.

MELO, G. A. S. Infraordem Brachyura. Siris e carangueijos: espécies marinhas e estuarinas. In: Os crustáceos do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Ed. da Universidade Federal do Sul, 503, 1999.

MISHRA, V. Oxidative stress and role of antioxidant supplementation in critical illness. **Clin Lab** **53**, 199-209, 2007.

MORI, T; COWLEY, A. W. Jr. Renal Oxidative Stress in Medullary Thick Ascending Limbs Produced by Elevated NaCl and Glucose. **Hypertension** **43**: 341-46, 2004.

MOSSER, D. D.; CARON, A. W.; BOURGET, L; DENIS-LAROSE, C.; MASSIE, B.
Role of the human heat shock protein Hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. **Mol. Cell. Biol.** **17**: 5317-327, 1997.

ODUM, E.P. **Ecologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

OLIVEIRA, U. O.; ARAÚJO, A. S. R.; BELLÓ-KLEIN, A. ; SILVA, R. S. M.; KUCHARSKI, L. C. Effects of environmental anoxia different periods of reoxygenation on oxidative balance in gill of estuarine crabs *Chasmagnathus granulata*. **Comp. Biochem. Physiol. B** **140**: 51-57, 2005.

PAUL, R. K. G. Observations on the ecology and distribution of swimming crabs on the genus *Callinectes* (Decapoda, Brachyura,Portunidae) in the Gulf of California, Mexico. **Crustaceana** **42**: 96-100, 1982.

PITA, J. B.; RODRIGUES, E. S.; GRAÇA LOPES, R.; COELHO, J. A. P.
Levantamento preliminar da Família Portunidae (Crustacea, Decapoda, Brachyura) no complexo Baía estuário de Santos, São Paulo, Brasil. **Bol. Inst. Pesca** **12**: 153-62, 1985.

RITOSSA, F. M. A new puffin pattern induced by a temperature shock and DNP in *Drosophila*. **Experientia** **18**: 571-73, 1962.

ROSS, S. W.; DALTON, D. A.; KRAMER, S.; CHRISTENSEN, B. L. Physiological (antioxidant) responses of estuarine fishes to variability in dissolved oxygen. **Comp. Biochem. Physiol. C** **130**: 289-303, 2001.

SANCHEZ, Y. and LINDQUIST, S. L. HSP104 required for induced thermotolerance.

Science. 248:1112-15, 1990.

SHARP, F. R. Stress proteins are sensitive indicators of injury in the brain produced by ischemia and toxins. **J. Toxicol. Sci. 20:** 450-53, 1995.

SHARP, F. R.; MASSA, S. M. and SWANSON, R. A. Heat-shock protein protection. **Trends Neurosci. 22:** 97-99, 1999.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, M. T.; CRONIN, M. T., MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidant in normal physiological functions and human diseases. **Int. J. Biochem. Cell Biol. 39,** 44-84, 2007.

WERNER, I. The influence of salinity on the heat-shock protein response of *Potamocorbula amurensis* (Bivalvia). **Mar. Environ. Res. 58:** 803-07, 2004.

YENARI, M. A.; GIFFARD, G. R. G.; SAPOLSKY, R. M. and STEINBERG, G. K. The neuroprotective potential of heat shock protein 70 (HSP70). **Mol. Med. Today 5:** 525-31, 1999.

ZHANG, Y.; HUANG, L.; ZHANG, J.; MOSKOPHIDIS, D.; MIVECHI, N. F. Targeted disruption of hsf1 leads to lack of thermotolerance and defines tissue-specific regulation for stress-inducible Hsp molecular chaperones. **J. Cell. Biochem. 86:** 376-93, 2002.

CAPÍTULO 1

**Estresse oxidativo induzido por exposição ao ar e à variação de salinidade em
siris *Callinectes danae* e *Callinectes ornatus***

RESUMO

Crustáceos decápodos são bastante diversos no ambiente marinho costeiro. Braquiúros tais como *Callinectes danae* e *Callinectes ornatus* habitam desde a região entre-marés até várias dezenas de metros de profundidade e são bastante tolerantes à variação de salinidade. *Callinectes danae* apresenta ciclo de vida dependente da variação de salinidade, habitando estuário até o momento da reprodução quando as fêmeas ovígeras migram para áreas de maior profundidade e salinidade, o mesmo não tendo sido relatado para *C. ornatus*. A resposta do sistema antioxidante de ambas as espécies à variação de salinidade foi avaliada, para preencher lacuna na literatura, que tem privilegiado a variação no oxigênio dissolvido e até na temperatura como agentes estressantes em animais marinhos. Foram determinadas as atividades de GPX, catalase e GST, assim como níveis de proteínas carboniladas e peroxidação lipídica em hepatopâncreas, brânquias (anterior e posterior) e músculo de *Callinectes danae* e *Callinectes ornatus* diante de estresse hipersalino (40‰) e hiposalino (10‰), além da exposição ao ar. A espécie dependente de variações de salinidade para as diferentes fases do ciclo de vida (*C. danae*), apresentou alta atividade de GPX e catalase constitutivamente, principalmente em hepatopâncreas e músculo, quando comparada aos animais controle da espécie que não é dependente das variações de salinidade (*C. ornatus*). Este fato parece influenciar a atividade dessas enzimas durante as situações de estresse, pois não ocorreu aumento da atividade de GPX e catalase em *C. danae*, como ocorreu em *C. ornatus*. GST não mostrou resposta significativa aos estresses apresentados, fortalecendo o conceito de seu maior

envolvimento diante de estresse químico. Os resultados sugerem ainda que a salinidade foi importante indutor da atividade de GPX e catalase e que *Callinectes danae* e *Callinectes ornatus* apresentaram mecanismos distintos de modulação da atividade de destas enzimas, suficientes para evitar danos oxidativos a lipídios e proteínas durante o estresse de oxigênio e o estresse salino.

Keywords: *Callinectes*, catalase, estresse oxidativo, GPX, GST, proteínas carboniladas, salinidade, TBARS

INTODUÇÃO

Cerca de 0,1% de todo o oxigênio consumido pelos vertebrados e alguns invertebrados não é totalmente reduzido à água, o que resulta na formação de várias espécies reativas de oxigênio (ROS). Os organismos aeróbicos desenvolveram defesas endógenas contra os produtos tóxicos do metabolismo do oxigênio. Danos oxidativos induzidos pelas ROS ocorrem por um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, fato que caracteriza o estresse oxidativo (Ahmad, 1995. Hermes-Lima, 2004; Mishra, 2007). O ânion superóxido (O_2^-), cuja formação está ligada à cadeia respiratória mitocondrial e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), formado durante a dismutação do O_2^- , têm baixa toxicidade, contudo podem ser convertidas a espécies altamente tóxicas às células, como o radical hidroxil ($\bullet OH$) que pode danificar macromoléculas como DNA, lipídios e proteínas (Janero et al., 1991; Cadenas, 1995; Fridovich, 1998; De Zwart et al., 1999; Hermes-Lima et al., 2001; Hermes-Lima, 2004).

A linha de defesa antioxidante primária nos animais é constituída pelos antioxidantes de natureza não enzimática, cuja maioria provém da dieta, como por exemplo vitamina E, carotenóides e, pelos antioxidantes de natureza enzimática, cujas principais enzimas são a glutathione peroxidase dependente de selênio (Se-GPX), a catalase (CAT), a glutathione S-transferase (GST) e todas as isoformas de superóxido dismutases (Mn-SOD, isoforma mitocondrial; CuZn-SOD, isoforma citosólica, Fe-SOD, isoforma bacteriana) (Hermes-Lima, 2004). A catalase é uma enzima peroxissomal que converte H_2O_2 em $2H_2O$ e O_2 quando este se acumula na célula (Alberts et al., 1997). A Se-GPX também catalisa a decomposição de H_2O_2 e ainda peróxidos orgânicos, usando a glutathione reduzida como co-substrato. Todas as isoformas de SOD catalisam a dismutação de O_2^- em H_2O_2 e O_2 . A GST tem atividade

antioxidante ao auxiliar a atividade de Se-GPX junto a peróxidos orgânicos e ao catalisar a conjugação de xenobióticos a GSH (Ahmad, 1995; Fridovich, 1998; Hermes-Lima et al., 1998).

Em geral, a atividade das enzimas antioxidantes é aumentada em resposta ao estresse, contudo nem sempre a resposta adaptativa do sistema é suficiente para compensar e evitar danos oxidativos ao organismo. O sistema antioxidante animal pode ser modulado durante o estresse oxidativo, mas a capacidade modulatória não é padronizada, sendo estresse, tecido e espécie-específica. (Crawford et al., 2000). Vários estudos têm considerado como modelo animais adaptados a situações ambientais que geram estresse oxidativo, para evidenciar adaptações do sistema antioxidante que permitam a estes animais sobreviver a situações que causariam sérios danos. A principal resposta observada nos animais com grande potencial para estresse oxidativo é o aumento das defesas antioxidantes. Em situações de privação do oxigênio sazonal, a rã leopardo (*Rana pipiens*), a “garter snake” (*Thamnophis sirtalis parietalis*) e caracóis terrestres (*Helix aspersa*) aumentam sua capacidade antioxidante aumentando a atividade das enzimas antioxidantes, como preparo para o potencialmente nocivo estresse da reperfusão com oxigênio (Hermes-Lima and Storey, 1993a; Hermes-Lima and Storey, 1996). Na tartaruga de água doce (*Trachemys scripta elegans*), o mecanismo antecipatório das defesas antioxidantes durante exposição ao ar é pouco relevante, o que ocorre é a manutenção de alta atividade constitutiva das enzimas antioxidantes que permite ao animal lidar com o estresse oxidativo que surge durante a reoxigenação após a hibernação embaixo da água (Hermes-Lima et al., 1998, 2001). Por outro lado, no peixe dourado ambos os mecanismos parecem estar presentes, além da “up-regulation” da catalase e G₆PDH existe alta atividade constitutiva de GR, GPX e GST, assim a tolerância a exposição

ao ar nestes animais envolve a ativação e manutenção da atividade das enzimas antioxidantes (Hermes-Lima and Zenteno-Savin, 2002; Lushchak et al., 2002).

O estuário é uma massa de água costeira que possui ligação com o mar aberto que, influenciado pelos movimentos das marés, apresenta mistura da água doce com a água do mar em proporções variadas durante o dia, resultando em flutuação de salinidade. O ambiente estuarino poderia ser considerado apenas uma área de transição entre o ambiente marinho e o de água doce, porém suas características ecológicas o tornam um ecossistema diferenciado, que permite intensa atividade reprodutiva a inúmeras espécies de moluscos, crustáceos, equinodermas e peixes, que encontram nos estuários proteção contra predadores e alimento abundante para um crescimento rápido (Odum, 1988). Foi observado que caranguejos estuarinos (*Chasmagnathus granulatus*) apresentam aumento da capacidade antioxidante como estratégia de preparo ao estresse da exposição ao ar e reoxigenação provocada pelo ciclo de marés (Oliveira et al., 2005). Estudo com peixes estuarinos mostrou que, a atividade das principais enzimas antioxidantes foi maior em estuários que apresentavam maior amplitude de variação média no oxigênio dissolvido (Ross et al., 2001). Assim, animais estuarinos tornam-se importantes modelos de estudo dos efeitos da variação das condições ambientais sobre os mecanismos de resposta do sistema antioxidante, dada a rapidez das suas flutuações ambientais. A literatura carecia de estudos relacionando o estresse oxidativo em animais marinhos com a variação na salinidade. Existe uma relação direta entre o estresse salino e o aumento na produção de ROS. Foi observado que alterações na concentração de solutos, principalmente Na^+ , são importante fator indutor de estresse oxidativo em medula renal de ratos (Mori et al., 2004).

Dentre as espécies de animais estuarinos, os crustáceos mais comuns são os da ordem dos decápodes existindo grande diversidade de braquiúros (carangueijos e

siris). *Callinectes danae* e *Callinectes ornatus* são braquiúros pertencentes à família Portunidae, a qual se distribui por toda a costa Atlântica Ocidental, desde a América do Norte até o sul da América do Sul (Melo, 1996). Nas regiões sul e sudeste do Brasil os representantes desta família que se destacam pela abundância são *Callinectes sapidus*, *Callinectes danae*, Smith, 1869 e *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 (Baptista et.al., 2003). *Callinectes ornatus* habita fundos de areia e conchas, com registro de ocorrência desde a região entre-marés até 75 m de profundidade. Por outro lado, *Callinectes danae* é uma espécie também registrada da região entre-marés até 75 m de profundidade, também com grande tolerância à variação de salinidade, podendo ocupar áreas estuarinas, pois as fêmeas ovígeras migram para áreas de maior profundidade e salinidade como estratégia para obtenção de ambiente mais favorável ao desenvolvimento e dispersão da prole e o desenvolvimento do embrião (Melo, 1999; Chacur et al., 2000; Baptista et.al., 2003). De fato; *Callinectes danae* mostrou ser a espécie numericamente dominante no complexo estuarino de Santos (SP), contribuindo com mais de 92% do total dos animais coletados (Pita et al., 1985a).

A hipótese testada por este estudo foi a de que duas espécies próximas de siris do mesmo gênero, mas com ciclos de vida ligeiramente diferentes, apresentariam respostas distintas de seu sistema antioxidante diante de estresse de oxigênio e salino.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Siris do gênero *Callinectes* (*Callinectes danae* Smith, 1869 e *Callinectes ornatus* Ordway, 1863) com 8 a 10 cm de tamanho e de ambos os sexos foram

coletados nos meses de junho à dezembro junto às bancas de pescadores do Balneário de Ipanema (25°37'30"S, 48°25'08"W), provenientes de arrasto comercial do camarão com redes tipo porta, malha de 2 cm entrenós opostos e 1 hora de duração, sendo os siris rejeitos da pesca camaroeira. Após a coleta, os animais foram acondicionados em isopor e transportados para o laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Paraná, onde permaneceram em aquário estoque contendo água do mar a 33‰ ± 2, luz natural durante 5 dias, sendo alimentados com pequenos camarões. Aquários com salinidades 40‰ (40 g de sal marinho para cada litro de água doce filtrada) e 10‰ (10 g de sal marinho para cada litro de água doce filtrada) foram preparados. Após aclimação os animais foram divididos em grupos: Controle (C): salinidade 33‰, exposição ao ar (Ae): exposto ao ar por 3 horas, reoxigenação (Ro): reoxigenados por 50 min após exposição de 3 horas ao ar, hipersalino (He): permanência de 2 horas a salinidade de 40‰, retorno do hipersalino (RHe): retorno à salinidade de 33‰ por 1 hora após permanecer por 2 horas em 40‰, hiposalino (Ho): permanência de 2 horas a 10‰, retorno do hiposalino (RHo): retorno à salinidade de 33‰ por 1 hora após permanecer 2 horas em 10‰. Após terem sido submetidos às condições experimentais e controle a hemolinfa foi coletada por punção pela base dos pereiópodos dos animais ainda vivos através de seringa, para dosagem da osmolalidade e concentração do íon cloreto. Em seguida os animais foram sacrificados com seção rápida do seu sistema nervoso central por incisão de tesoura na carapaça, entre as órbitas oculares. Foram retirados: hepatopâncreas, brânquias anteriores (B1 a B3), brânquias posteriores (B6 a B8) e fragmento de músculo da quela para dosagem dos níveis de proteínas carboniladas, peroxidação lipídica e ensaio das atividades enzimáticas de: glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona-S-transferase (GST) e catalase (CAT) nestes tecidos. As brânquias foram separadas

em anteriores e posteriores por terem função distinta nos caranguejos braquiúros: as anteriores realizam respiração (trocas gasosas), e as posteriores realizam transporte de sal (osmorregulação) (Péqueux, 1995).

Reagentes

Todos os componentes dos tampões, dos solventes e os álcoois foram de grau analítico e obtidos da Reagen Quimibrás Indústria Brasileira SA. Glutathione redutase de levedura (GR), 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno, 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNFH), EDTA, NADH, NADPH, NADP⁺, glutathione (GSH), glutathione oxidada (GSSG), fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), cloreto de guanidina, peróxido de hidrogênio (30%), ácido sulfosalicílico 5%, butilato hidroxitolueno e ácido tiobarbitúrico foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St Louis, USA).

Estresse Osmótico- Determinação das Concentrações Osmótica e Iônica da Hemolinfa

As amostras da hemolinfa de *C. danae* e *C. ornatus* controles e experimentais foram dosadas quanto à sua osmolalidade em Micro-osmômetro de pressão de vapor Wescor VAPRO 5520. As concentrações iônicas de cloreto foram determinadas em duplicata através de método colorimétrico, usando Kits Labtest (Lagoa Santa, MG, Brasil), segundo protocolo do fabricante, em amostras diluídas apropriadamente em água deionizada.

Ensaio das Enzimas Antioxidantes

Preparação dos Extratos Teciduais: Os tecidos armazenados a -70°C foram transferidos para N₂ líquido para serem pesados e homogeneizados em tampão fosfato de potássio (50 mM) (pH 7.2) contendo EDTA (0,5 mM) e 1% de fluoreto de fenilmetilsulfonil (10 µM) (PMSF) (diluição 1:15 para músculo e 1:20 para os demais

tecidos). Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados a 4°C por 15 min a 13000 g e os sobrenadantes (extrato enzimático) utilizados nos diversos ensaios e para dosagem de proteínas. A concentração de proteínas das amostras foi dosada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). A cinética de cada enzima foi determinada espectrofotometricamente através da velocidade de variação de absorbância (coeficiente angular da reta de absorbância por minuto).

A atividade da glutathione peroxidase (GPX) foi determinada utilizando-se o consumo de H_2O_2 (0,2 mM) como substrato para medir atividade da GPX dependente de selênio e, através do ensaio de oxidação de NADPH catalisado por GR, determinou-se o consumo basal de NADPH da amostra (Hermes-Lima and Storey, 1995). O extrato enzimático armazenado a -70°C foi descongelado e mantido no gelo. A cubeta (1 mL) para leitura foi preparada contendo tampão fosfato (50 mM), EDTA (0,5 mM), NaN_3 (2 mM), NADPH (0,15 mM), GR (1,5 U/mL), GSH (5 mM), H_2O_2 (0,2 mM), H_2O e amostra. Os reagentes foram pipetados na cubeta e lidos imediatamente a 340 nm. Para o ensaio foi feito o controle total, leitura de todos os reagentes exceto o extrato enzimático e, para cada amostra foi feito o controle parcial contendo todos os reagentes exceto H_2O_2 . Para o cálculo da atividade de Se-GPX foram descontados da leitura da amostra, os valores lidos dos controles parcial e total em 30 segundos.

A atividade da catalase foi determinada através do consumo de H_2O_2 (10 mM) adicionado ao extrato enzimático do tecido (amostra). O extrato enzimático armazenado a -70°C foi descongelado e mantido no gelo. A cubeta (1 mL) para leitura recebeu: tampão fosfato (50 mM), EDTA (0,5 mM), H_2O_2 (2 mM), H_2O e amostra (diluição final 1:20). Os reagentes foram pipetados e lidos (240 nm) imediatamente no espectrofotômetro. Um controle para cada amostra foi lido na ausência de H_2O_2 (Hermes-Lima and Storey, 1993a). Para o cálculo da atividade da

catalase foi descontado da leitura da amostra o valor lido do controle em 20 segundos.

A atividade da glutathiona-S-transferase (GST) foi determinada a partir da conjugação de GSH com 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), detectável a 340 nm. O extrato enzimático armazenado a -70°C foi descongelado e mantido no gelo. A cubeta (1 mL) para leitura recebeu: tampão fosfato (50 mM), EDTA (0,5 mM), CDBN (1 mM), GSH (1 mM), H_2O e amostra. Os reagentes foram pipetados e lidos a 240 nm. Para o ensaio foi feito o controle total, leitura na presença de todos os reagentes exceto o extrato enzimático, e para cada amostra foi feito o controle parcial contendo todos os reagentes exceto GSH. Para o cálculo da atividade de GST foram descontados da leitura da amostra os valores lidos dos controles parcial e total em 20 segundos (Hermes-Lima and Storey, 1993b).

Ensaio de Avaliação do Dano Oxidativo

Os níveis de proteínas carboniladas foram determinados pelo método adaptado de LENS (1989) (Ramos-Vasconcelos and Hermes-Lima, 2002). Os tecidos armazenados a -70°C foram transferidos para N_2 líquido para serem pesados e homogenatos em ácido sulfosalicílico 5% (diluição de 1:20). Os homogenatos foram (400 μL) transferidos para tubos (1 tubo para o branco e 1 tubo para amostra) e centrifugados por 5 min a 10.000xg. O sobrenadante foi incubado por 1 h com 500 μL de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNFH 10mM preparado em HCl 2 M) (os brancos foram incubados com 500 μL de HCl 2 M) agitando-se de 15 em 15 min. Após a incubação, as proteínas foram precipitadas com 500 μL de ácido tricloroacético 20%, centrifugadas por 3 min a 15.000xg, os sobrenadantes descartados e, em seguida lavadas três vezes com 1 mL de etanol e acetato de etila (1v:1v). O precipitado foi ressuspensão em cloreto de guanidina 6 M e incubado por 15 min a 37°C . Após

centrifugação de 5 min a 9.000xg os sobrenadantes foram coletados para a leitura. As proteínas carboniladas foram quantificadas, espectrofotometricamente, considerando-se a máxima absorbância entre 340-410 nm.

O método utilizado quantifica produtos aldeídicos da peroxidação lipídica, os quais reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA) (Uchiama and Mihara, 1978). Os tecidos armazenados a -70°C foram transferidos para N_2 líquido para serem pesados e homogenatos em ácido fosfórico (1,1%) (diluição de 1:15). Os homogenatos foram aliquotados (400 μL) em tubos contendo: 200 μL H_3PO_4 (7%), 200 μL TBA (1%) em NaOH (50 mM) e 200 μL BHT (0,1 mM) em etanol (ajustado para pH 1.6) Foi feito 1 branco para cada amostra contendo 400 μL de HCl (3 mM). Após serem incubadas por 15 min a 100°C e resfriadas adicionou-se às amostras 1,5 mL de 1-butanol. As amostras foram agitadas e centrifugadas a 1.000xg por 4 min para separação da fase orgânica, a qual foi lida espectrofotometricamente a 532 nm (formação do complexo TBA2-aldeídos) e a 600 nm (formação de compostos que interferem no sistema). Os níveis de produtos da peroxidação lipídica foram calculados subtraindo-se as absorbâncias a 600 nm (Hermes-Lima and Storey, 1995).

Os ensaios das enzimas superóxido dismutase e glutathione redutase não detectaram atividade em nenhum dos tecidos de ambas as espécies de siris.

Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi através de análise de variância de uma via e teste pós hoc de “Tukey” para avaliação dos efeitos dos tratamentos, para cada espécie, cada tecido, cada parâmetro. Testes-*t* de Student foram aplicados para comparar os valores dos controles das duas espécies. Todos os testes tiveram limite de significância em 0,05.

RESULTADOS

Osmolalidade e Concentração de Cloreto da Hemolinfa

A osmolalidade da hemolinfa no grupo controle (Co) foi de 811 ± 48.8 mOsm/kg H₂O em *C. danae* e 847 ± 34.2 mOsm/kg H₂O em *C. ornatus*. Houve redução da osmolalidade da hemolinfa de ambas as espécies de siris submetidos à condição hiposmótica (Ho): 589 ± 78.0 mOsm/kg H₂O foi encontrado em *C. danae*, e 499 ± 63.9 mOsm/kg H₂O em *C. ornatus*. A osmolalidade da hemolinfa não retornou aos valores do controle após 1 h em salinidade controle de 33‰ (RHo), tanto em *C. danae* (743 ± 55.7 mOsm/kg H₂O) como em *C. ornatus* (757 ± 38.2 mOsm/kg H₂O) (**Fig. 1.1A, 1.1B**).

O mesmo padrão foi observado para a concentração de cloreto na hemolinfa. Nos grupos controle os valores mensurados foram de 452 ± 24.4 mEq/L em *C. danae* e 486 ± 9.6 mEq/L em *C. ornatus*. Os animais submetidos ao choque hiposmótico apresentaram baixos valores de cloreto na hemolinfa: 304.2 ± 30.8 mEq/L (*C. danae*), e 280 ± 34.6 mEq/L (*C. ornatus*). Novamente, como ocorreu com a osmolalidade, a concentração de cloreto da hemolinfa dos animais que retornaram as condições do controle por 1 hora foram ainda inferiores aos apresentados pelos grupos controle: 227 ± 38.1 mEq/L (*C. danae*), and 350 ± 17.7 mEq/L (*C. ornatus*) (**Fig. 1.1C, 1.1D**).

Glutathione Peroxidase (GPX)

Callinectes danae submetidos a exposição ao ar (Ae) e reoxigenação (Ro) não apresentaram alterações na atividade de GPX (**Fig. 1.2A**). Em *Callinectes ornatus*, houve aumento de 4,7 vezes em hepatopâncreas e de 3 vezes em brânquia anterior nos animais do grupo Ro, quando comparados com os do Co. As brânquias

posteriores não apresentaram alteração na atividade de GPX durante exposição ao ar e reoxigenação (**Fig. 1.2B**). Em músculo, houve aumento de 2,4 vezes na atividade de GPX dos animais submetidos a exposição ao ar quando comparados aos do grupo controle (**Fig. 1.2B**).

Durante o estresse salino, atividade de GPX foi 4 vezes menor em hepatopâncreas do grupo hiposalino (Ho) de *C. danae* quando comparado ao controle (**Fig. 1.3A**). Todos os tecidos de *C. ornatus*, exceto brânquia posterior, apresentaram aumento significativo da atividade de GPX durante o estresse hipersalino (He) quando comparados ao controle, sendo de: 2,4 vezes em hepatopâncreas, 1,8 vez em brânquia anterior e de 5,3 vezes em músculo (**Fig. 1.3B**). Somente em hepatopâncreas de *C. ornatus*, a atividade de GPX não retornou aos valores do controle após 1 h em salinidade 33‰ (RHe) (**Fig. 1.3B**). A atividade de GPX dos grupos controle de hepatopâncreas e músculo de *C. danae* foi estatisticamente maior que as observadas nos controles dos mesmos tecidos de *C. ornatus* (**Fig 1.2A, 1.2B e 1.3A e 1.3B**).

Catalase

Em hepatopâncreas de *Callinectes danae* submetidos a exposição ao ar (Ae) houve redução de 9,7 vezes na atividade da catalase, enquanto em brânquia anterior e músculo a atividade da catalase foi diminuída em 4 vezes nos animais do grupo reoxigenação (Ro) quando comparados aos do grupo controle (**Fig. 1.4A**). Somente no músculo de *C. ornatus* houve aumento da atividade da catalase durante a exposição ao ar (3,2 vezes), quando comparado ao grupo controle (**Fig. 1.4B**).

Os tecidos de *C. danae* não tiveram alteração significativa da atividade da catalase durante os diferentes tipos de estresse salino (**Fig. 1.5A**). Em hepatopâncreas de *C. ornatus*, houve aumento de 2,6 vezes na atividade da catalase

no grupo He quando comparado ao grupo controle e, no grupo RHe a atividade da catalase retornou aos valores do controle (**Fig. 1.5B**). No grupo RHo a atividade da catalase foi aumentada em 3,6 vezes quando comparada ao do grupo controle (**Fig. 1.5B**). Em brânquias anteriores e posteriores de *C. ornatus* houve aumento da atividade da catalase de 3 e 2,4 vezes respectivamente, no animais do grupo He quando comparados ao controle (**Fig. 1.5B**). A atividade da catalase dos grupos controle dos tecidos de *C. danae* foi estatisticamente maior que as observadas nos controles dos tecidos de *C. ornatus* (**Fig. 1.4A, 1.4B e 1.5A e 1.5B**).

Glutathione S-Transferase (GST)

Em ambas espécies não houve alterações na atividade de GST nos tecidos dos animais submetidos a exposição ao ar e reoxigenação (**Fig. 1.6A, 1.6B**). Durante as variações de salinidade, somente as brânquias anteriores de *C. danae* apresentaram aumento de 1,3 vez na atividade de GST no grupo He ($123 \pm 14,7$) quando comparado ao grupo Co ($77,1 \pm 12,3$) (**Fig. 1.7A**). Em *C. ornatus*, a atividade de GST em hepatopâncreas foi reduzida no grupo RHe ($218 \pm 60,4$) em relação ao grupo He (606 ± 63) (**Fig. 1.7B**).

Proteínas Carboniladas

Em ambas espécies não houve alterações dos níveis de proteínas carboniladas nos tecidos dos animais submetidos a exposição ao ar e reoxigenação (**Fig. 1.8A, 1.8B**). O único efeito do estresse salino em *C. danae* ocorreu em músculo, o grupo RHe apresentou maiores níveis de proteínas carboniladas ($137 \pm 54,6$) que o grupo He ($27,3 \pm 7,9$) (**Fig. 1.9A**). Não houve diferença significativa nos níveis de proteínas carboniladas nos tecidos de *C. ornatus* expostos a diferentes salinidades e o grupo controle (**Fig. 1.9B**).

Peroxidação Lipídica

Em ambas espécies não houve aumento significativo dos níveis de peroxidação lipídica nos tecidos dos animais submetidos a exposição ao ar e reoxigenação (**Fig. 1.10A, 1.10B**) através do método TBARS. As variações na salinidade não produziram variações significativas nos níveis de peroxidação lipídica dos tecidos de *C. danae* (**Fig. 1.11A**) através do método TBARS. Os níveis de peroxidação lipídica em hepatopâncreas de *C. ornatus* submetidos ao estresse hipersalino ($61,8 \pm 10,4$) foi 2 vezes maior que os níveis apresentados pelos animais do grupo controle ($31,3 \pm 7$). Em brânquias anteriores de *C. ornatus* os níveis de peroxidação lipídica durante o estresse hipersalino ($18,5 \pm 3,8$) foi significativamente maior que os níveis observados nos demais grupos experimentais (RHe $5,7 \pm 1$, Ho $3,1 \pm 1,5$ e RHo $5,4 \pm 1,6$) e quando comparados aos animais do grupo controle ($18,5 \pm 3,8$) (**Fig. 1.11B**).

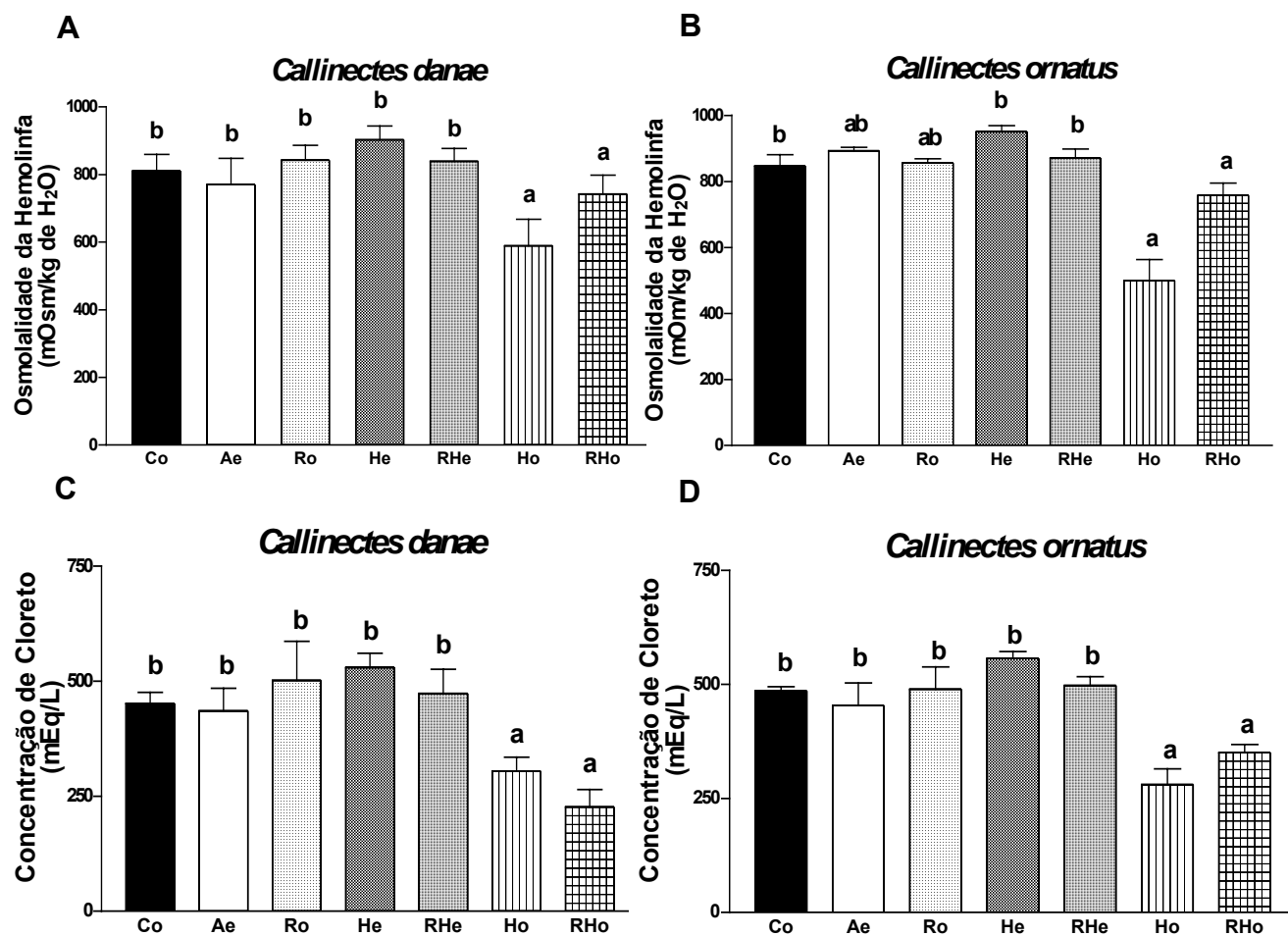
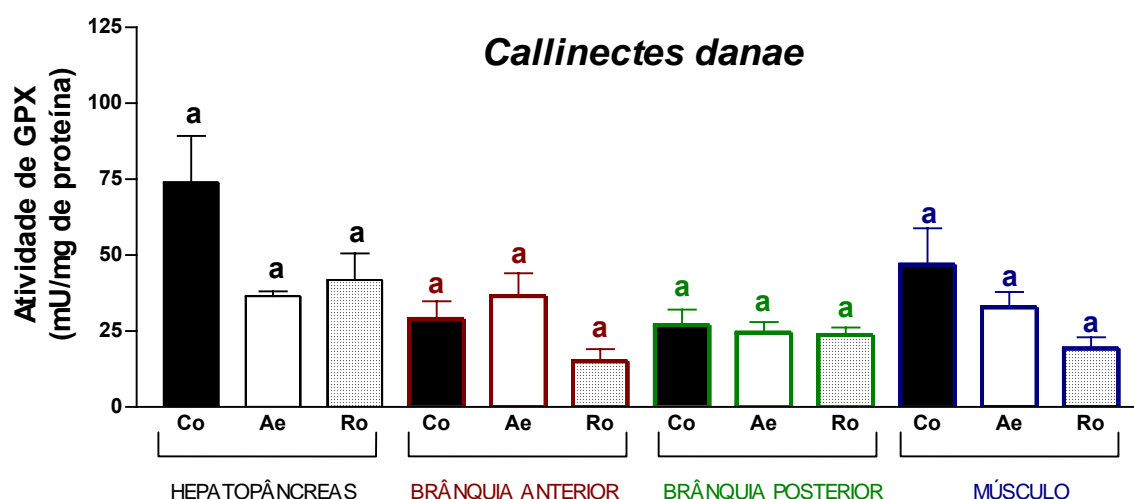


Figura 1.1. Osmolalidade da hemolinfa (mOsm/kg de H₂O) de **(A)** *Callinectes danae* e **(B)** *Callinectes ornatus* e a concentração de cloreto (mEq/L) da hemolinfa de **(C)** *Callinectes danae* e **(D)** *Callinectes ornatus* dos grupos controle (Co), exposição ao ar (Ae), reoxigenação (Ro), hipersalino (He), retorno do hipersalino (RHe), hiposalino (Ho) e retorno do hiposalino (RHo). Valores da média \pm EPM de 11 (Co), 7 (He, Ho) e 6 (An, Ro, RHo, RHe) animais. Grupos que não compartilham letras são diferentes estatisticamente ($p < 0,05$).

A



B

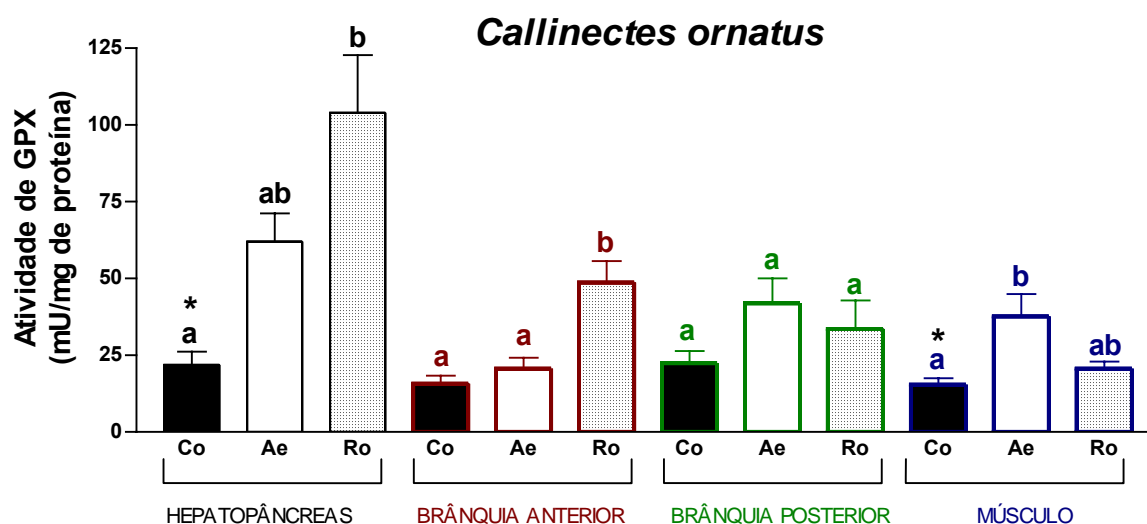


Figura 1.2. Exposição ao Ar. Atividade de glutatona peroxidase (mU/mg proteína) em hepatopâncreas, brânquia anterior, brânquia posterior e músculo de **(A)** *Callinectes danae* e **(B)** *Callinectes ornatus* dos grupos controle (Co), exposição ao ar (Ae), reoxigenação (Ro). Os valores são média \pm EPM de 11 (Co), e 6 (An, Ro) animais. Grupos que não compartilham letras minúsculas sobre as barras são diferentes estatisticamente ($p < 0,05$). Foi realizada análise estatística em cada tecido separadamente. *Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos controle de *C. ornatus* quando comparados aos respectivos grupos controle de *C. danae*.

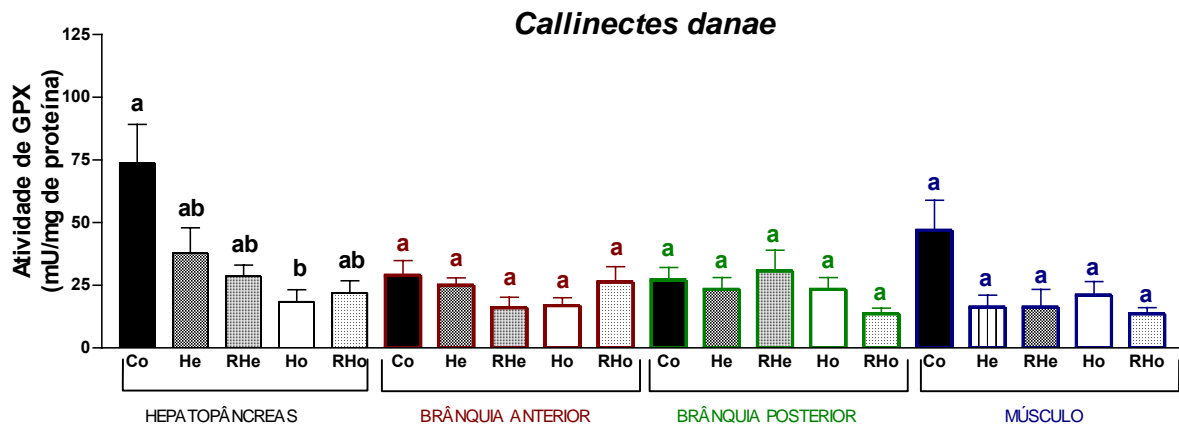
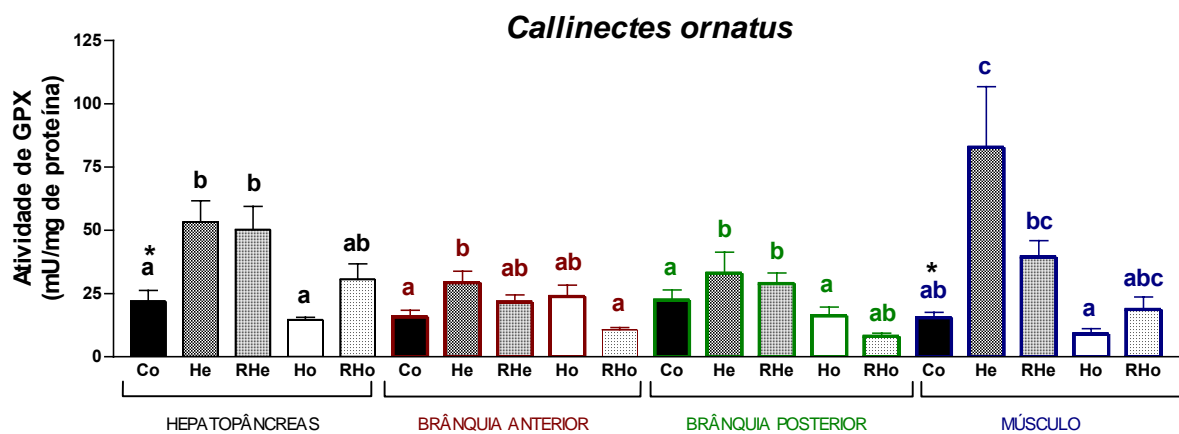
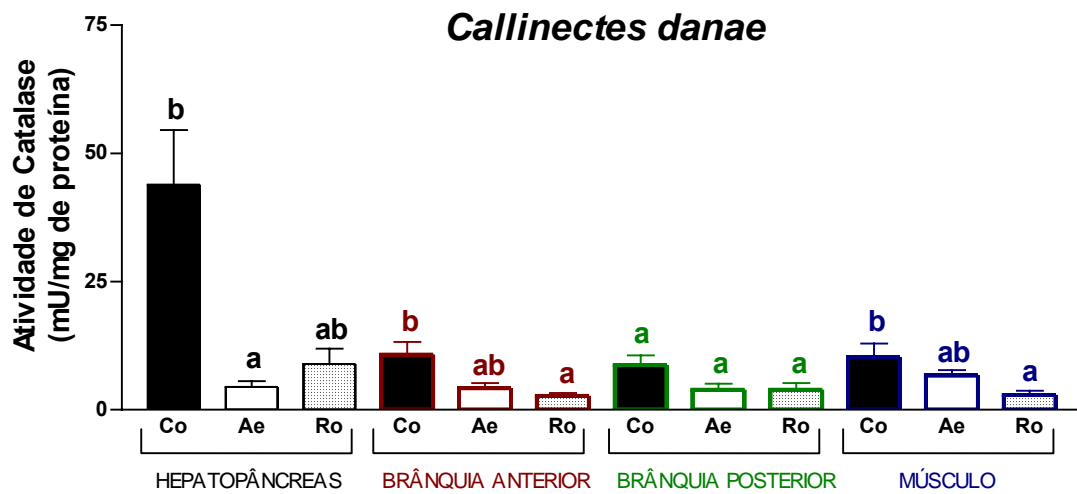
A**B**

Figura 1.3. Variação de Salinidade. Atividade de glutatona peroxidase (mU/mg proteína) em hepatopâncreas, brânquia anterior, brânquia posterior e músculo de **(A)** *Callinectes danae* e **(B)** *Callinectes ornatus* dos grupos controle (Co), hipersalino (He), retorno do hipersalino (RHe), hiposalino (Ho) e retorno do hiposalino (RHo). Os valores são média \pm EPM de 11 (Co), 7 (He, Ho) e 6 (RHo, RHe) animais. Grupos que não compartilham letras minúsculas sobre as barras são diferentes estatisticamente ($p < 0,05$). Foi realizada análise estatística em cada tecido separadamente. *Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos controle de *C. ornatus* quando comparados aos respectivos grupos controle de *C. danae*.

A



B

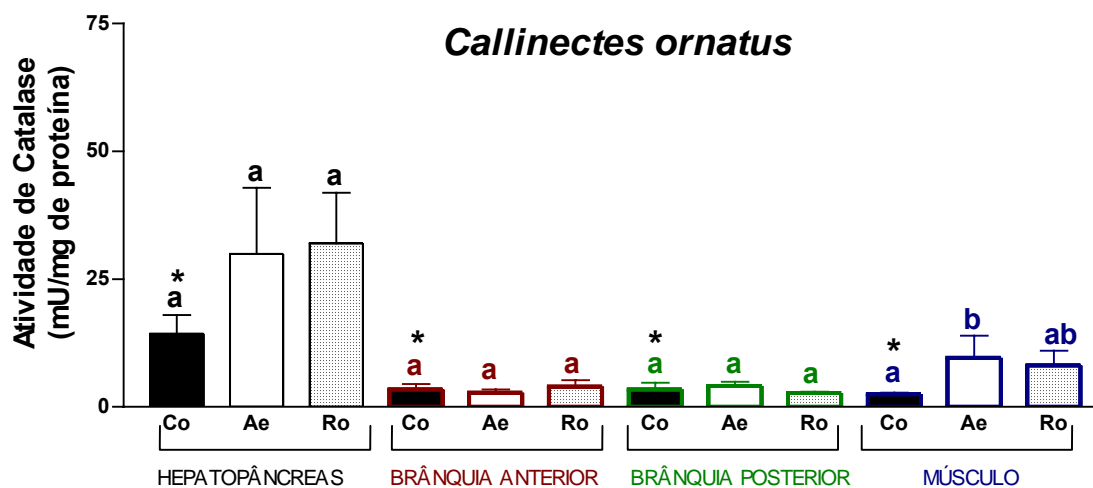


Figura 1.4. Exposição ao Ar. Atividade da Catalase (mU/mg proteína) em hepatopâncreas, brânquia anterior, brânquia posterior e músculo de (A) *Callinectes danae* e (B) *Callinectes ornatus* dos grupos controle (Co), exposição ao ar (Ae), reoxigenação (Ro). Os valores são média \pm EPM de 11 (Co), e 6 (Ae, Ro) animais. Grupos que não compartilham letras minúsculas sobre as barras são diferentes estatisticamente ($p < 0,05$). Foi realizada análise estatística em cada tecido separadamente. *Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos controle de *C. ornatus* quando comparados aos respectivos grupos controle de *C. danae*.

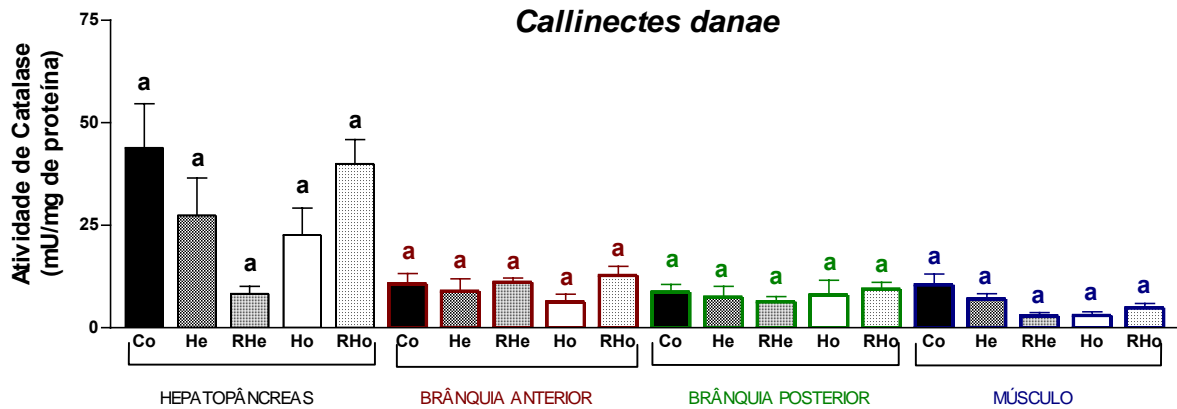
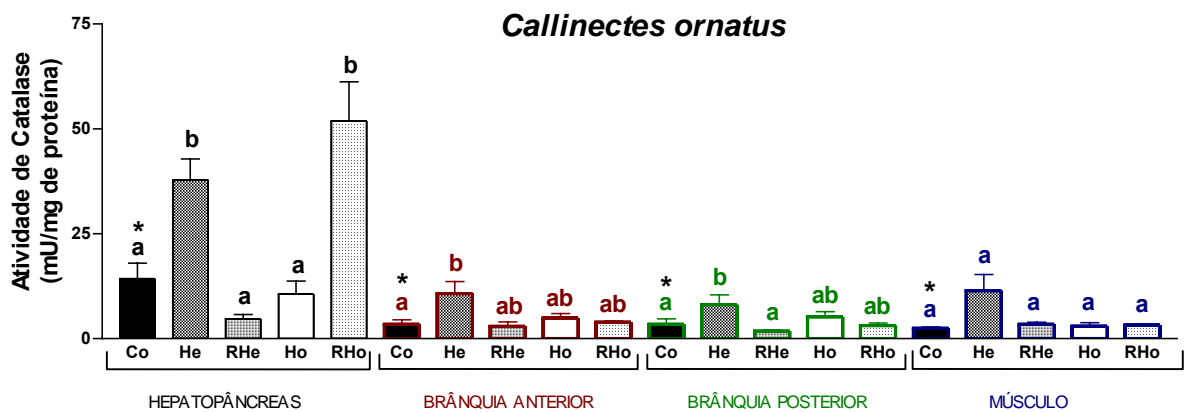
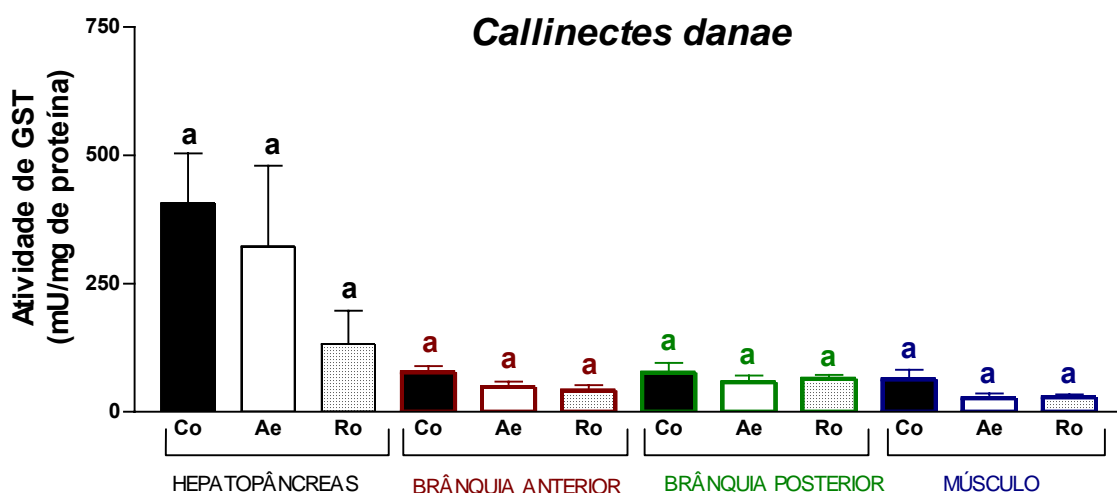
A**B**

Figura 1.5. Variação de Salinidade. Atividade da Catalase (mU/mg proteína) em hepatopâncreas, brânquia anterior, brânquia posterior e músculo de (A) *Callinectes danae* e (B) *Callinectes ornatus* dos grupos controle (Co), hipersalino (He), retorno do hipersalino (RHe), hiposalino (Ho) e retorno do hiposalino (RHo). Os valores são média \pm EPM de 11 (Co), 7 (He, Ho) e 6 (RHo, RHe) animais. Grupos que não compartilham letras minúsculas sobre as barras são diferentes estatisticamente ($p < 0,05$). Foi realizada análise estatística em cada tecido separadamente. *Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos controle de *C. ornatus*, quando comparados aos respectivos grupos controle de *C. danae*.

A



B

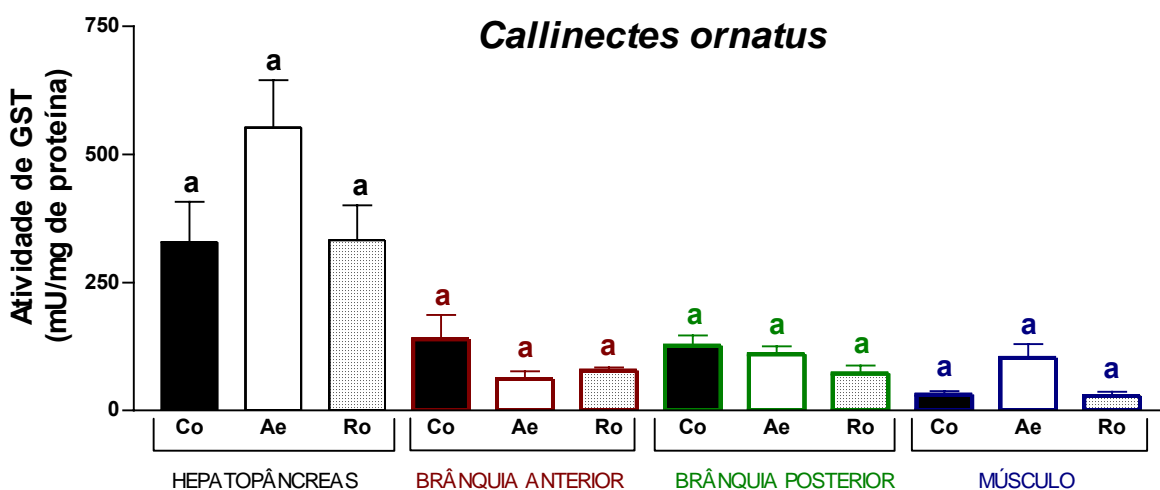


Figura 1.6. Exposição ao Ar. Atividade da Glutathione S-Transferase (mU/mg proteína) em hepatopâncreas, brânquia anterior, brânquia posterior e músculo de **(A)** *Callinectes danae* e **(B)** *Callinectes ornatus* dos grupos controle (Co), exposição ao ar (Ae), reoxigenação (Ro). Os valores são média \pm EPM de 11 (Co), e 6 (Ae, Ro) animais. Grupos que não compartilham letras minúsculas sobre as barras são diferentes estatisticamente ($p < 0,05$). Foi realizada análise estatística em cada tecido separadamente.

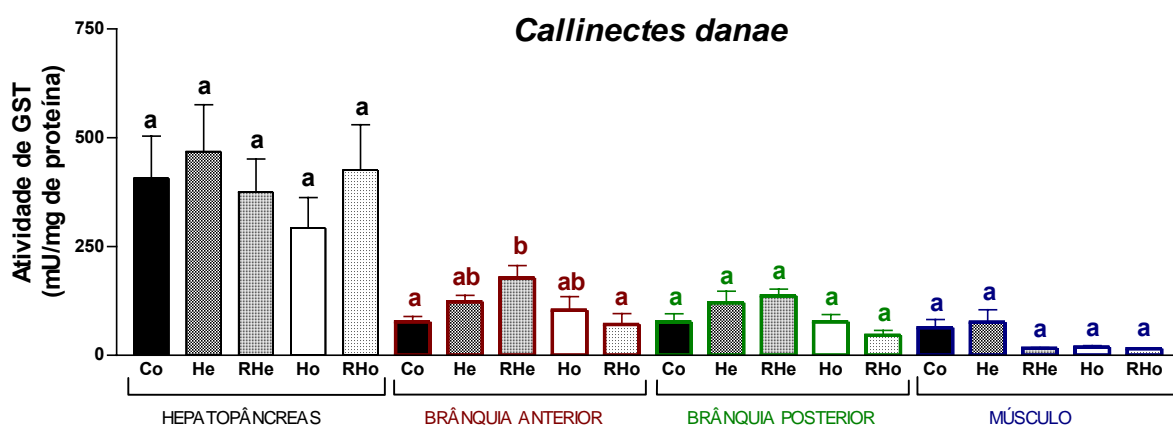
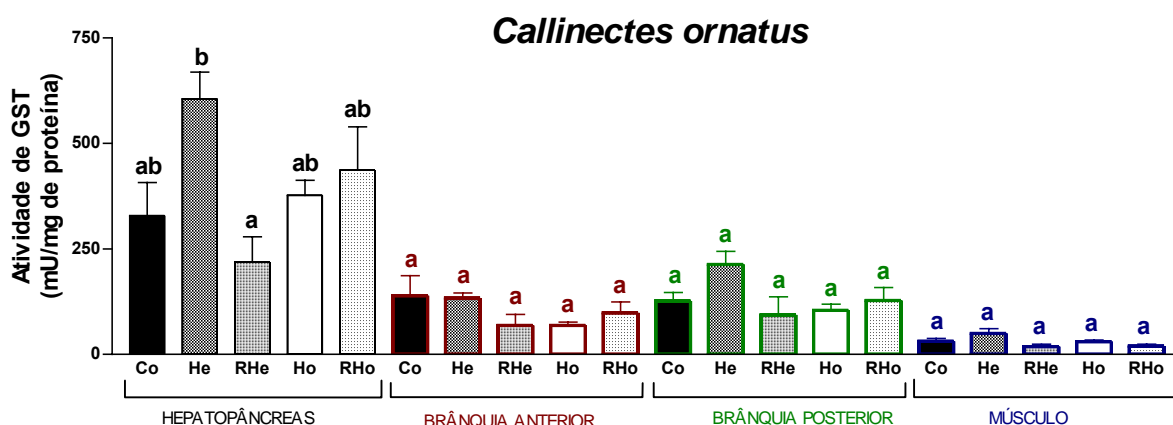
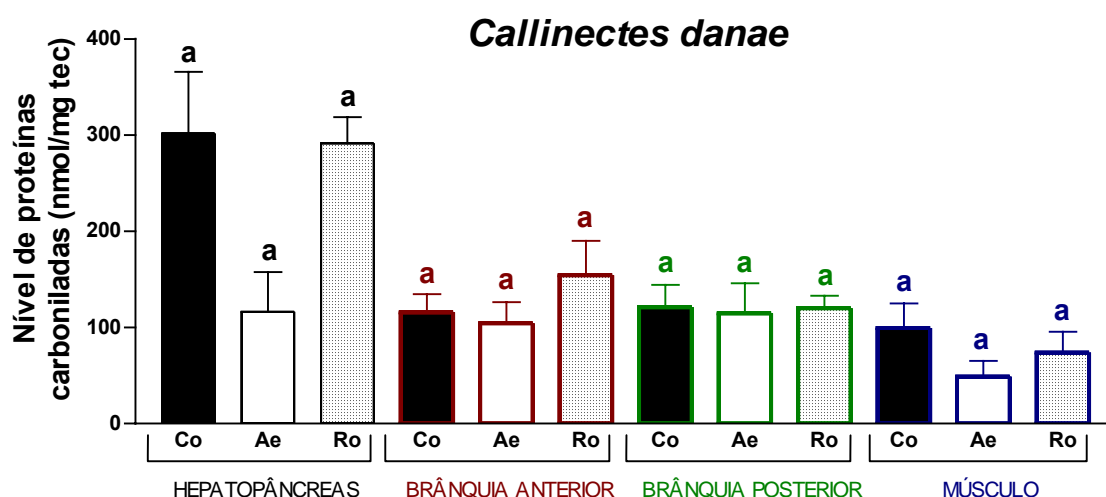
A**B**

Figura 1.7. Variação de Salinidade. Atividade da Glutathione S-Transferase (mU/mg proteína) em hepatopâncreas, brânquia anterior, brânquia posterior e músculo de **(A)** *Callinectes danae* e **(B)** *Callinectes ornatus* dos grupos controle (Co), hipersalino (He), retorno do hipersalino (RHe), hiposalino (Ho) e retorno do hiposalino (RHo). Os valores são média \pm EPM de 11 (Co), 7 (He, Ho) e 6 (RHo, RHe) animais. Grupos que não compartilham letras minúsculas sobre as barras são diferentes estatisticamente ($p < 0,05$). Foi realizada análise estatística em cada tecido separadamente.

A



B

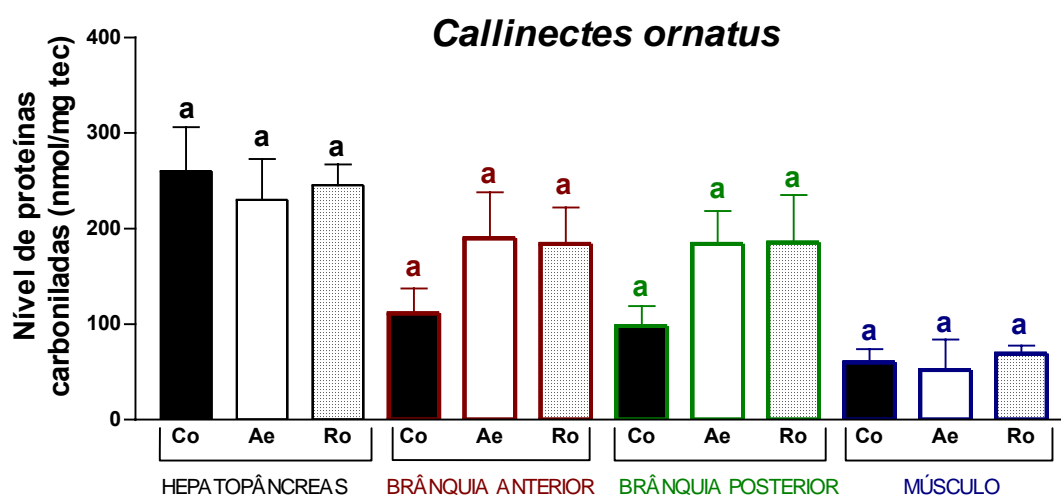


Figura 1.8. Exposição ao Ar. Níveis de Proteínas Carboniladas (nmol/mg tecido) em hepatopâncreas, brânquia anterior, brânquia posterior e músculo de (A) *Callinectes danae* e (B) *Callinectes ornatus* dos grupos controle (Co), exposição ao ar (Ae), reoxigenação (Ro). Os valores são média \pm EPM de 11 (Co), e 6 (An, Ro) animais. Grupos que não compartilham letras minúsculas sobre as barras são diferentes estatisticamente ($p < 0,05$). Foi realizada análise estatística em cada tecido separadamente.

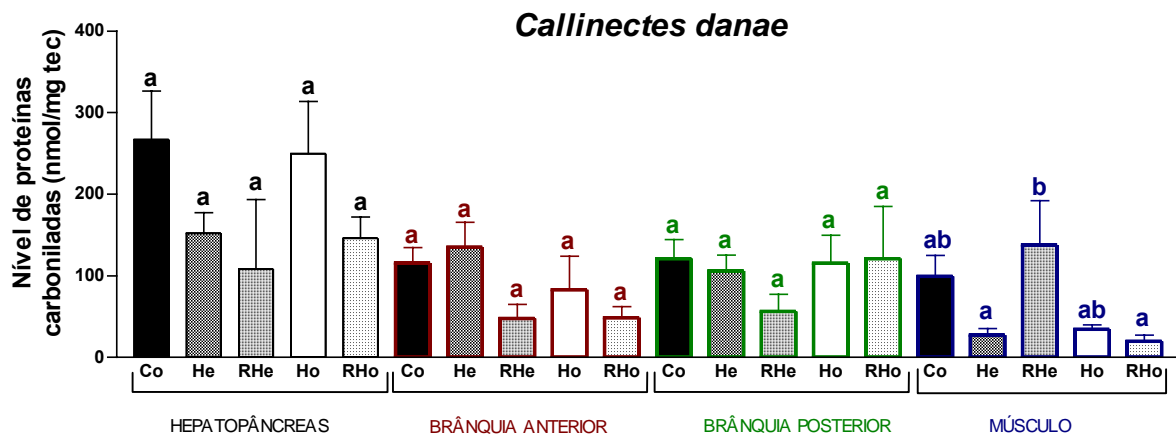
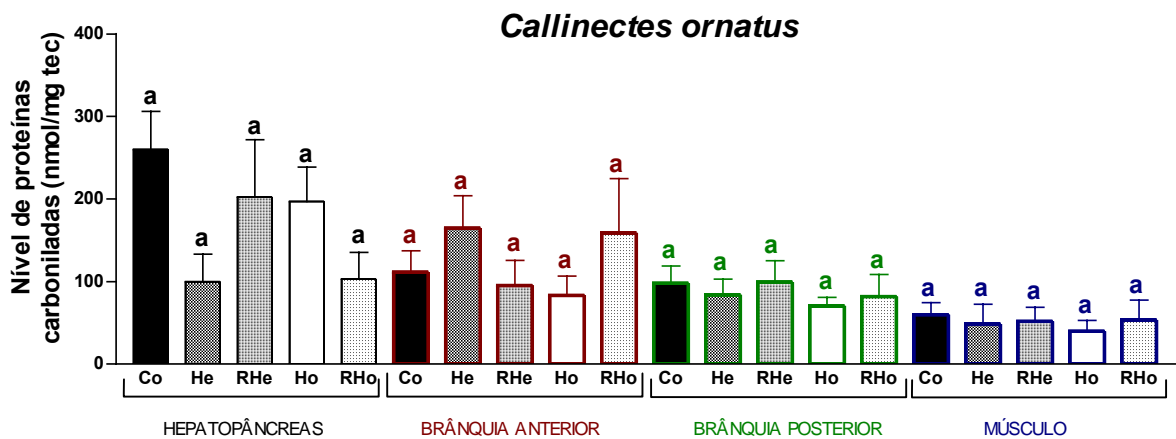
A**B**

Figura 1.9. Variação de Salinidade. Níveis de Proteínas Carboniladas (nmol/mg tecido) em hepatopâncreas, brânquia anterior, brânquia posterior e músculo de **(A)** *Callinectes danae* e **(B)** *Callinectes ornatus* dos grupos controle (Co), hipersalino (He), retorno do hipersalino (RHe), hiposalino (Ho) e retorno do hiposalino (RHo). Os valores são média \pm EPM de 11 (Co), 7 (He, Ho) e 6 (RHo, RHe) animais. Grupos que não compartilham letras minúsculas sobre as barras são diferentes estatisticamente ($p < 0,05$). Foi realizada análise estatística em cada tecido separadamente.

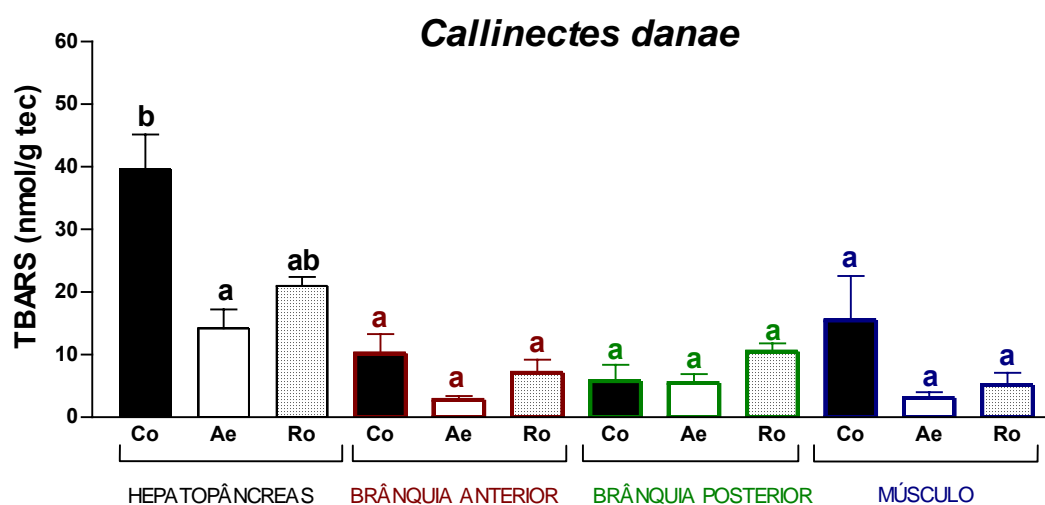
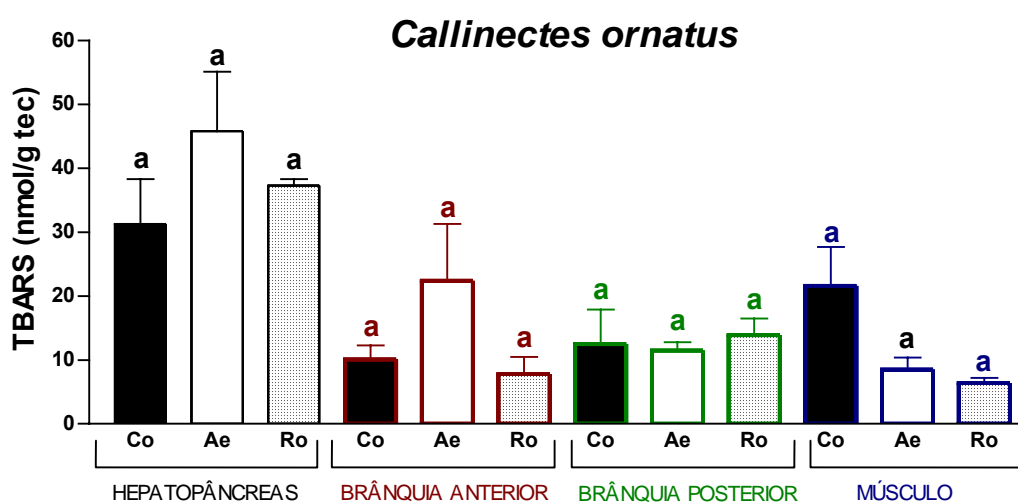
A**B**

Figura 1.10. Exposição ao Ar. Níveis de Peroxidação lipídica (TBARS) (nM/g tec.) em hepatopâncreas, brânquia anterior (ant.), brânquia posterior (post) e músculo de (A) *Callinectes danae* e (B) *Callinectes ornatus* dos grupos controle (Co), exposição ao ar (Ae), reoxigenação (Ro). Os valores são média \pm EPM de 11 (Co), e 6 (An, Ro) animais. Grupos que não compartilham letras minúsculas sobre as barras são diferentes estatisticamente ($p < 0,05$). Foi realizada análise estatística em cada tecido separadamente.

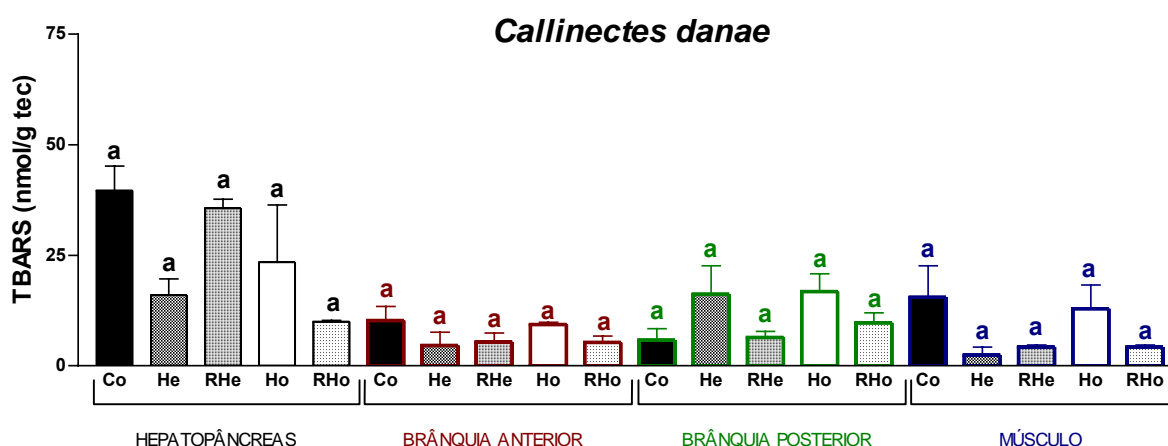
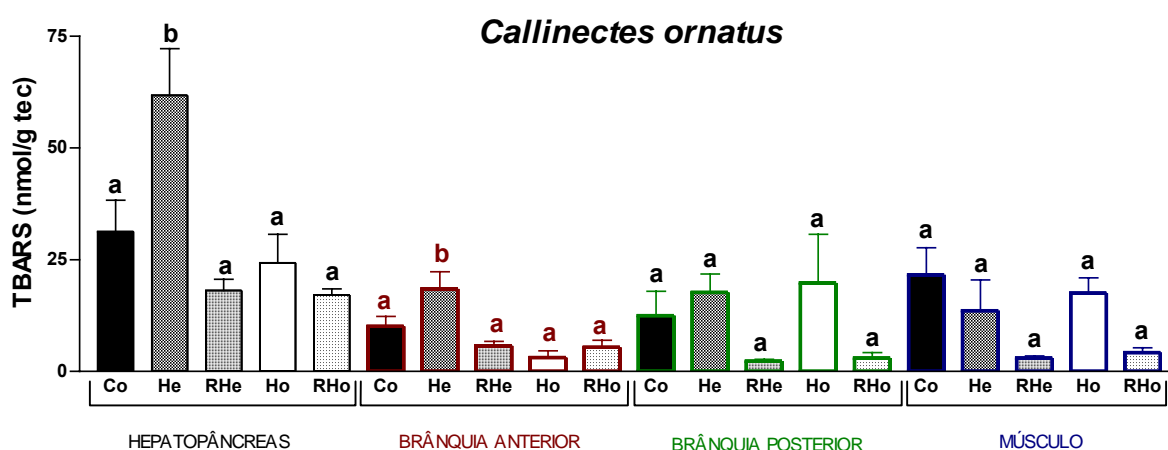
A**B**

Figura 1.11. Variação de Salinidade. Níveis de Peroxidação lipídica (TBARS) (nM/g tecido) em hepatopâncreas, brânquia anterior (ant.), brânquia posterior (post.) e músculo de **(A)** *Callinectes danae* e **(B)** *Callinectes ornatus* dos grupos controle (Co), hipersalino (He), retorno do hipersalino (RHe), hiposalino (Ho) e retorno do hiposalino (RHo). Os valores são média \pm EPM de 11 (Co), 7 (He, Ho) e 6 (RHo, RHe) animais. Grupos que não compartilham letras minúsculas sobre as barras são diferentes estatisticamente ($p < 0,05$). Foi realizada análise estatística em cada tecido separadamente.

DISCUSSÃO

Callinectes danae, Smith, 1869 e *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 são representantes da família Portunidae e se distribuem por toda a costa Atlântica Ocidental (Melo, 1996). No litoral do Paraná (Brasil), essas espécies são exploradas como recursos pesqueiros e possibilitam a complementação alimentar e econômica das comunidades litorâneas. Devido à abundância destes animais na Baía de Paranaguá, estes também constituem um dos principais rejeitos da pesca do camarão (Baptista et.al., 2003, 2005). *Callinectes danae* ocorre em estuários, mangues, praias e em mar aberto, mostrando que tolera grandes variações de salinidade (Williams 1984, apud Chacur and Negreiros-Fransozo, 2001). A ocorrência de *C. danae* tanto em ambiente bastante instável (estuário e entre-marés), como em ambiente estável (mar aberto) ocorre devido à necessidade da variação de salinidade durante o seu ciclo de vida. Durante o seu desenvolvimento e crescimento da fase juvenil até a fase adulta habita regiões de baixa salinidade (estuário) e para a desova e incubação dos ovos necessita de ambiente de alta salinidade (baía) (Paul, 1982 apud Chacur et al., 2000; Chacur et al., 2000). Foi observado que o tamanho com que *C. danae* atinge a maturidade sexual e o tamanho com que as fêmeas iniciam a migração para o mar aberto são coincidentes, mostrando que os processos são interdependentes (Pita et al., 1985a). A migração de fêmeas ovígeras para áreas de maior salinidade pode estar relacionado com o fato de que os estágios larvais são menos tolerantes as variações de salinidade que ocorrem no estuário, e ainda pelo fato de que a alta salinidade facilita a flutuação das volumosas larvas e a dispersão da prole (Pita et al., 1985b; Negreiros-Fransozo and Fransozo, 1995; Branco and Mansunari, 2000; Chacur et al., 2000; Chacur and Negreiros_Fransozo, 2001; Baptista et al., 2005).

C. ornatus habita desde a zona de praia até aproximadamente 75 m de profundidade, apesar de ser encontrada também em estuário (Baptista et al., 2003). Contudo, o levantamento faunístico dirigido à família Portunidae, no complexo Baía-Estuário de Santos (SP), não evidenciou *C. ornatus* procedentes do estuário (Pita et al., 1985a) e estudo mais recente da região mostrou predomínio desta espécie a partir de 25 m de profundidade (Braga et al., 2005). A ocorrência de formas juvenis na Baía, durante o ano todo sugere que *C. ornatus* aparentemente não apresenta o mesmo mecanismo de migração estuário-baía observado durante a reprodução de *C. danae* (Negreiros-Fransozo and Fransozo, 1995). De fato, a variação da osmolalidade da hemolinfa corrobora o fato de que ambas as espécies são eurialinas (**Fig 1.1**), podendo habitar regiões de grande variação de salinidade. Contudo, a grande diferença entre as duas espécies consiste no fato de que *C. danae* necessita da variação de salinidade para seu ciclo de vida, enquanto *C. ornatus* tolera variações na salinidade mas não é dependente desta para seu ciclo de vida.

A enzima GPX não tem apenas ação complementar à da catalase, mas desempenha importante papel na proteção contra o estresse oxidativo decompondo hidroperóxidos orgânicos, como os hidroperóxidos formados a partir de ácidos graxos (LOOH) (Hermes-Lima, 2004). Assim, a atividade de GPX parece ser essencial para animais marinhos, os quais apresentam grande quantidade de ácidos graxos insaturados compondo suas membranas biológicas (Joseph, 1982). Tanto o estresse de oxigênio como o estresse salino não induziram aumento da atividade de GPX nos tecidos de *C. danae* (**Fig 1.2A e 1.3A**), e a espécie apresentou altos níveis de atividade de GPX nos animais controle, inclusive em comparação com outros invertebrados (**Tab. 1**). Foi observado que tartarugas de água doce têm alta atividade constitutiva das enzimas antioxidantes como adaptação para lidar com o estresse oxidativo produzido pelo seu ciclo de vida (Hermes-Lima et al., 2001). Também a

tolerância a exposição ao ar vista no peixe dourado envolve a manutenção de alta atividade de GPX, catalase e GR em determinados órgãos (Lushchak et al., 2002). Provavelmente, mecanismo semelhante é utilizado por *C. danae*, devido ao fato de habitar obrigatoriamente ambientes variáveis durante o seu ciclo de vida. Assim, a manutenção de altas atividades constitutivas parece ser estratégia preparatória de animais que enfrentam ambientes variáveis, tanto ao longo do ano quanto ao longo do dia e das marés. Curiosamente, houve redução da atividade de GPX em *C. danae* durante o estresse salino (**Fig 1.3A**). Fato semelhante foi observado em fígado de peixes, o esturjão *Acipenser naccarii*, quando aclimatados a maior salinidade. A redução da atividade de GPX, catalase e SOD observada nos esturjões foi relacionada com o aumento das proteínas totais em fígado e não devido ao estresse oxidativo (Martínez-Álvarez et al., 2002). Nossos resultados corroboram os resultados obtidos para peixes estuarinos, reforçando o conceito de que animais que vivem em ambiente com maior variação dos parâmetros ambientais apresentam maior atividade das enzimas antioxidantes (Ross et. al., 2001).

Durante o estresse de oxigênio em *C. ornatus*, a resposta antioxidante em hepatopâncreas e brânquia anterior foi induzida pela re-introdução de oxigênio após exposição ao ar, mas em músculo houve indução da atividade de GPX durante exposição ao ar (**Fig 1.2B**), sugerindo mecanismo antecipatório ao estresse da reperfusão, corroborando o fato de que a modulação das enzimas antioxidante é tecido-específica. (Crawford et al., 2000). De fato, mecanismo antecipatório das defesas antioxidantes produzindo aumento da atividade de GPX foi observado em outros animais tolerantes a exposição ao ar, como em cobras, rãs e peixe dourado (Hermes-Lima and Zenteno-Sávin, 2002; Luschak et al., 2002). O estresse hipersalino mostrou ser importante indutor da atividade de GPX em *C. ornatus* (**Fig. 1.3B**), possivelmente devido ao aumento do consumo de oxigênio exigido para gerar energia

utilizada na osmorregulação e manutenção da osmolalidade da hemolinfa durante o aumento de salinidade. De fato, a elevada concentração de sódio extracelular levou ao aumento da taxa metabólica e das concentrações intracelulares de O_2^- e H_2O_2 , gerando conseqüentemente estresse oxidativo em medula renal de ratos (Mori et al., 2004). Tecidos com altas taxas metabólicas mostram maior atividade de GPX do que outros tecidos (Hermes-Lima, 2004). O estresse hipersalino, diferente do hiposalino, parece ser detectado em *C. ornatus* como uma situação de alerta, induzindo a resposta do sistema antioxidante. Curiosamente, o estresse hiposalino (gerando redução da osmolalidade da hemolinfa) produziu maior prejuízo à homeostasia dos siris do que o hipersalino, porém não induziu estresse oxidativo ou a resposta do sistema enzimático antioxidante. Este resultado é interessante e sugere que para estes crustáceos é mais usual e menos estressante ter que lidar com redução de salinidade (por exemplo, que aconteceria em estuário) do que com o aumento da salinidade. Apesar da diluição da hemolinfa, seus tecidos provavelmente conseguem regular seu volume satisfatoriamente diante de entrada de água (Péqueux, 1995), e estas alterações não induzem a formação de radicais livres. De forma interessante, não houve diferenças consistentes entre o padrão de respostas das brânquias anteriores e posteriores aos estresses de oxigênio e salino, apesar de suas diferenças morfológicas (e.g., espessura do epitélio, presença ou não de grandes quantidades de mitocôndrias) e funcionais. As brânquias anteriores possuem epitélio bem mais fino e poucas mitocôndrias, tendo função de respiração. As posteriores, por outro lado, apresentam epitélio bem espesso, rico em mitocôndrias e dobramentos de membrana basolateral, tendo função de osmorregulação (Péqueux, 1995).

A catalase é a enzima antioxidante que degrada H_2O_2 gerado na célula para oxidar vários substratos como fenóis, ácido fórmico, formaldeídos e álcoois tornando-os pouco tóxicos. Quando H_2O_2 se acumula na célula, a catalase o decompõe em

H₂O e O₂ (Alberts et al., 1997). Semelhante aos resultados obtidos para GPX, *C. danae* apresentou atividade constitutiva de catalase significativamente maior do que *C. ornatus* (**Fig 1.4 e 1.5**), mostrando claramente que as duas espécies apresentam mecanismos distintos de modulação do sistema antioxidante. Contudo, é importante salientar que o estresse salino em *C. ornatus* foi mais efetivo na indução da resposta da catalase do que o estresse de oxigênio (**Fig 1.4B e 1.5B**). Estes resultados corroboram a própria ecofisiologia da espécie que é encontrada tanto em águas rasas (praia), onde pode haver menor disponibilidade de oxigênio, como em águas profundas (75 m), mas não experimenta obrigatoriamente variações de salinidade (Negreiros-Fransozo and Fransozo, 1995; Baptista et al., 2003). Foi observado que gastrópodes (*Limpets*) de zona entre-marés apresentam maior atividade da catalase, quando comparados a animais congêneres que habitam sublitoral (Malanga et al., 2003). Por outro lado, o estresse salino poderia ser responsável pela geração de altas concentrações de H₂O₂, já que a função da catalase parece ser mais efetiva quando ocorre grande elevação na concentração de H₂O₂, enquanto o pequeno aumento de H₂O₂ é melhor controlado por GPX (Hermes-Lima, 2004). Neste trabalho não foi mensurada a quantidade de H₂O₂ produzida durante os diferentes tipos de estresse.

A atividade da catalase vem sendo constantemente utilizada para monitorar o *status* oxidativo de animais marinhos e estuarinos expostos a substâncias tóxicas, e até como forma de biomonitoramento de regiões poluídas (Brouwer and Brouwer, 1998; Geracitano et al., 2004; Kressiba et al., 2003; Pinho et al., 2005; Silva et al., 2005). Contudo, nossos resultados mostraram que a atividade da catalase pode ser fortemente influenciada pela salinidade. De fato, a influência da temperatura, salinidade e luz foram importantes fatores na resposta da atividade da catalase em moluscos marinhos expostos a organoclorados (Kressiba et al., 2003), e o aumento da atividade da catalase em poliquetas estuarinos induzida pela poluição foi maior

durante o verão (Geracitano et al., 2004). Recomenda-se assim que, para a utilização eficaz da catalase como biomarcador, considere-se também a influência da salinidade sobre os resultados.

A função da GST envolve a conjugação de GSH a produtos aldeídos da peroxidação lipídica e a substâncias xenobióticas, constituindo uma das principais linhas de defesa antioxidante contra xenobióticos. A indução da atividade de GST tem sido relacionada com a resistência das células cancerígenas às drogas utilizadas na quimioterapia e a capacidade de determinados insetos de anular os efeitos de inseticidas (Hermes-Lima, 2004). O aumento da atividade da GST vem sendo observado em animais expostos a poluentes, mostrando ser importante biomarcador da exposição à poluição principalmente em animais estuarinos (Vinagre et al., 2003; Manduzio et al., 2004, Silva et al., 2005).

O estresse de oxigênio não induziu a atividade de GST nas espécies estudadas (**Fig 1.6**), o que poderia ser explicado pelo fato de que os animais foram cuidadosamente coletados em regiões não poluídas. Ocorreu alteração da atividade de GST em hepatopâncreas de *C. ornatus* durante o estresse salino (**Fig 1.7B**), o que pode estar relacionado com a função de hepatopâncreas que, como tecido hepático, apresenta grande capacidade de metabolização de produtos indesejáveis do metabolismo. De fato, GST corresponde a 5 a 10% das proteínas citoplasmáticas do fígado dos mamíferos (Hermes-Lima, 2004). Além disso, foi observado que ocorre grande variabilidade da atividade de GST em glândula digestiva de bivalvos (*Mytilus edulis*), fato que parece torná-lo impróprio para o biomonitoramento dos efeitos da poluição (Manduzio et al., 2004). Assim, nossos dados reforçam a função anti-xenobiótica atribuída a GST, uma vez que apenas a variação dos fatores abióticos, sem a presença de contaminantes, não afetou a atividade de GST.

Os resultados deste estudo mostraram que o aumento da salinidade foi importante indutor da atividade de GPX e catalase e que *Callinectes danae* e *Callinectes ornatus* apresentaram mecanismos distintos de modulação da atividade destas enzimas. A manutenção da alta atividade constitutiva das enzimas antioxidantes como estratégia de preparo para as variações ambientais evitou danos oxidativos ao tecidos de *Callinectes danae*. Por outro lado, *Callinectes ornatus* aumenta a atividade das enzimas antioxidantes quando exposto às variações ambientais, estratégia que não evitou danos oxidativos a lipídios. Ambas as espécies apresentaram estratégias diferentes para lidar com as variações de oxigênio e salinidade do meio, confirmando a hipótese original apresentada.

Tabela 1.1. Valores de atividade específica constitutiva da enzima glutathione peroxidase selênio-dependente (Se-GPX) em hepatopâncreas e músculo de alguns invertebrados.

	Se-GPX (mU/mg)	Referência
Hepatopâncreas		
<i>Littorina littorea</i>	13 - 15	Pannuzio and Storey (1998)
<i>Otala lactea</i>	10 - 12	Hermes-Lima and Storey (1995)
<i>Helix aspersa</i>	26,5 – 31,9	Ramos-Vasconcelos and Hermes-Lima (2002)
<i>Callinectes danae</i>	73,9 – 89,2	Este trabalho
<i>Callinectes ornatus</i>	21,9 – 26,2	Este trabalho
Músculo		
<i>Otala lactea</i>	4,9 – 5,3	Hermes-Lima and Storey (1995)
<i>Helix aspersa</i>	4,2 – 4,9	Ramos-Vasconcelos and Hermes-Lima (2002)
<i>Callinectes danae</i>	46,9 – 58,9	Este trabalho
<i>Callinectes ornatus</i>	15,5 – 17,6	Este trabalho

REFERÊNCIAS

- Ahmad, S.** (1995). Antioxidant mechanisms of enzymes and proteins. In: *Oxidative and Antioxidant Defenses in Biology* (ed. S. Ahmad), pp. 238-272. New York: Chapman & Hall.
- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J. D.** (1997). *Biologia Molecular da Célula* (Artes Médicas), pp 574. Porto Alegre.
- Baptista, C., Pinheiro, M. A. A., Blankensteyn, A. and Borzone, C. A.** (2003). Estrutura populacional de *Callinectes ornatus* Ordway (Crustacea, Portunidae) no Balneário de Shangri-lá, Pontal do Paraná, Paraná, Brasil. *Rev. Bras. Zool.* **20**, 661-666.
- Baptista-Metri, C., Pinheiro, M. A. A., Blankensteyn, A. and Borzone, C. A.** (2005). Biologia populacional de *Callinectes danae* Smith (Crustacea, Portunidae), no Balneário de Shangri-lá, Pontal do Paraná, Paraná, Brasil. *Res. Bras. Zool.* **22**, 446-453.
- Bradford, M.** (1976). A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye-Bonding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Braga, A., Fransozo, A. and Bertini, G.** (2005). Composição e abundância dos caranguejos (Decapoda, Brachyura) nas regiões de Ubatuba e Caraguatatuba, litoral norte paulista, Brasil. *Biota Neotrop.* **5**, 45-78.
- Branco, J. O. and Masunari, S.** (2000). Reproductive ecology of blue crab, *Callinectes danae* Smith, 1869 in the Conceição lagoon system, Santa Catarina Isle, Brazil. *Rev. Bras. Biol.* **60**, 17-27.
- Brouwer, M. and Brouwer, T. H.** (1998). Biochemical defense mechanisms against copper-induced oxidative damage in blue crabs, *Callinectes sapidus*. *Arch. Biochem. Biophys.* **351**, 257-264.
- Chacur, M. M., Mansur, C. B. and Negreiros-Fransozo, M. L.** (2000). Distribution patterns, seasonal abundance and moult cycle of *Callinectes danae* Smith, 1869 in Ubatuba region, Brazil. *Nauplius* **8**, 215-226.
- Chacur, M. M. and Negreiros-Fransozo, M. L.** (2001). Spatial and seasonal distribution of *Callinectes danae* (Decapoda, Portunidae) in Ubatuba Bay, São Paulo, Brazil. *J. Crust. Biol.* **21**, 414-425.
- Cadenas, E.** (1995). Mechanism of oxygen activation and reactive oxygen species detoxification. In: *Oxidative stress and Antioxidant Defenses in Biology* (ed. S. Ahmad), pp. 1-61. New York, Chapman & Hall.
- Crawford, D. R., Suzuki, T., and Davies, K. J. A.** (2000). Redox regulation of gene expression. In: *Antioxidant and redox regulation of genes* (Sen, C.K., Sies, H., & Baeuerle P.A. Eds), pp. 21-25. Academic Press, San Diego.

- De Zwart, L. L., Meerman, J. H. N., Commandeur, J. N. M. and Vermeulen, N. P. E.** (1999). Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 202-226.
- Fridovich, I.** (1998). Oxygen toxicity: a radical explanation. *J. Exp. Biol.* **201**, 1203-1209.
- Geracitano, L. A., Monserrat, J. M. and Bianchini, A.** (2004). Oxidative stress in *Laemoneris acuta* (Polychaeta, Nereididae): environmental and seasonal effects. *Mar. Environ. Res.* **58**, 625-630.
- Hermes-Lima, M., Storey, J. M. and Storey, K. B.** (1998). Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. *Comp. Biochem. Physiol. B* **120**, 437-448.
- Hermes-Lima, M., Storey, J. M. and Storey, K. B.** (2001). Antioxidant defenses and animal adaptation to oxygen availability during environmental stress. *Cell. Mol. Response Stress* **2**: 263-87.
- Hermes-Lima, M. and Storey, K. B.** (1995). Antioxidant defenses and metabolic depression in a pulmonate land snail. *Am. J. Physiol.* **268**: R1386-1393.
- Hermes-Lima, M.** (2004). Functional metabolism: *Regulation and Adaptation*, (eds Kenneth B Storey. Copyright John Wiley & Sons, Inc. pp. 320-368.
- Hermes-Lima, M. and Storey, K. B.** (1996). Relationship between anoxia exposure and antioxidant status in frog *Rana pipiens*. *Am. J. Physiol.* **271**: R918-925.
- Hermes-Lima, M. and Storey, K. B.** (1993a). Role of antioxidants in the tolerance of freezing and anoxia by garter snakes. *Am. J. Physiol.* **265**: R646-652.
- Hermes-Lima, M. and Storey, K. B.** (1993b). Oxidative inactivation of GST from freezing tolerance reptile. *Mol. Cell. Biochem.* **124**: 149-158.
- Hermes-Lima, M. and Zenteno-Savín, T.** (2002). Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol. C* **133**: 537-556.
- Janero, D. R., Hreniuk, D. And Sharif, H. M.** (1991). Hydrogen peroxide-induced oxidative stress to the mammalian heart-muscle cell (cardiomyocyte): Lethal peroxidative injury. *J. Cell. Physiol* **149**: 347-364.
- Joseph, J. D.** (1982). Lipid composition of marine and estuarine invertebrates. Part II. Mollusca. *Progr. Lipid Res.* **21**, 109-153.
- Khessiba, A., Roméo, M. and Aïssa, P.** (2005). Effects of some environmental parameters on catalase activity measured in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to lindane. *Environ. Pollut.* **133**: 275-281.

- Lenz, A. G., Costabel, U., Shaltiel, S. and Levine, R. L.** (1989). Determination carbonyl groups in oxidatively modified by reduction with tritiated sodium borohydride. *Anal. Biochem.* **177**:419-425.
- Lushchak, V. L., Lushchak, L. P., Mota, A. A. and Hermes-Lima, M.** (2001). Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *Am. J. Physiol.* **280**: R100-107.
- Negreiros-Fransozo, M. L. and Fransozo, A.** (1995). On the distribution of *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 and *Callinectes danae* Smith, 1869 (Brachyura, Portunidae) in the Fortaleza Bay, Ubatuba, Brazil. *Iheringia, Sér. Zool.* **(79)**:3-12.
- Manduzio, M, Monsinjon, T., Galap, C., Leboulenger, F. and Rocher, B.** (2004). Seasonal variations in antioxidant defenses in blue mussels *Littorina edulis* collected area: major contributions in gill of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and glutathione s-transferase. *Aquatic Toxicol.* **70**: 83-93.
- Malanga, G., Esteves, M. S., Calvo, J. and Puntarulo, S.** (2004). Oxidative stress in limpets exposed to different environmental conditions in Beagle Channel. *Aquatic Toxicol.* **69**: 299-309.
- Martínez-Álvarez, R. M., Hidalgo, M. C., Domezain, A., Morales, A. E., García-Gallego, M. and Sanz, A.** (2002). Physiological changes of sturgeon *Acipenser naccarii* caused by increasing environmental salinity. *J. Exp. Biol.* **205**: 3699-370.
- Melo, G. A. S.** (1996). Manual de identificação de Brachyura (carangueijos e siris) do litoral brasileiro (Ed. Plêiade/FAPESP), pp 604. São Paulo.
- Melo, G. A. S.** (1999). Infraordem Brachyura. Siris e carangueijos: espécies marinhas e estuarinas. In: *Os crustáceos do Rio Grande do Sul. Porto Alegre* (Ed. Universidade Federal do Sul), pp 503. Porto Alegre.
- Mishra, V.** (2007). Oxidative stress and role of antioxidant supplementation in critical illness. *Clin Lab* **53**, 199-209.
- Mori, T; Cowley, A. W. Jr.** (2004). Renal Oxidative Stress in Medullary Thick Ascending Limbs Produced by Elevated NaCl and Glucose. *Hypertension* **43**: 341-346.
- Odum, E.P.** (1988). *Ecologia* (Guanabara Koogan). Rio de Janeiro.
- Oliveira, U. O., Araújo, A. S. R., Belló-Klein, A., Silva, R. S. M. and Kucharski, L. C.** (2005). Effects of environmental anoxia different periods of reoxygenation on oxidative balance in gill of estuarine crabs *Chasmagnathus granulata*. *Comp. Biochem. Physiol. B* **140**: 51-57.
- Pannuzio, T. M. and Storey, K. B.** (1998). Antioxidant defenses and lipid peroxidation during anoxia stress and aerobic recovery in the marine gastropod *Littorina littorea* *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **221**, 277-292.

- Paul, R. K. G.** (1982). Observations on the ecology and distribution of swimming crabs on the genus *Callinectes* (Decapoda, Brachyura, Portunidae) in the Gulf of California, Mexico. *Crustaceana* **42**(1): 96-100.
- Péqueux, A.** (1995). Osmotic regulation in Crustacea. *J. Crust. Biol.* **15**: 1-60.
- Pinho, G. L. L., Rosa, C. M., Maciel, F. E., Bianchini, A., Yunes, J. S., Proença, L. A. O. and Monserrat, J. M.** (2005). Antioxidant responses and oxidative stress after microcystin exposure in the hepatopancreas of an estuarine crabs species. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **61**: 353-360.
- Pita, J. B., Rodrigues, E. S., Graça Lopes, R. and Coelho, J. A. P.** (1985a). Levantamento preliminar da Família Portunidae (Crustacea, Decapoda, Brachyura) no complexo Baía estuário de Santos, São Paulo, Brasil. *Bol. Inst. Pesca* **12** (3): 153-162.
- Pita, J. B., Rodrigues, E. S., Graça Lopes, R. and Coelho, J. A. P.** (1985b). Observações bioecológicas sobre o siri *Callinectes danae* Smith, 1869 (Crustacea, Portunidae) no complexo Baía estuário de Santos, Estado de São Paulo, Brasil. *Bol. Inst. Pesca*, **12** (4): 35-43.
- Ramos-Vasconcelos, G. R. and Hermes-Lima, M.** (2002). Hypometabolism, antioxidant and free radical metabolism in the pulmonate land snail *Helix aspersa*. *J. Exp. Biol.* **206**: 675-685.
- Ross, S. W., Dalton, D. A., Kramer, S. and Christensen, B. L.** (2001). Physiological (antioxidant) responses of estuarine fishes to variability in dissolved oxygen. *Comp. Biochem. Physiol. C* **130**: 289-303.
- Silva, A. Z., Zanette, J., Ferreira, J. F., Guzenski, J., Marques, M. R. F. and Bainy, A. C. D.** (2005). Effects of salinity on biomarker responses in *Crassostrea rhizophorae* (Mollusca, Bivalvia) exposed to diesel oil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **62**: 376-382.
- Uchiyama, M. and Mihara, M.** (1978). Determination of malonaldehyde in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem.* **86**: 271-278.
- Vinagre, T. M., Alciati, J. C., Regoli, F., Bocchetti, J. S., Bianchini, A. and Monserrat, J. M.** (2003). Effect of microcystin on ion regulation and antioxidant system in gills of the estuarine crabs *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol. C* **135**: 67-75.
- Williams, A. B.** (1984). Shrimps, Lobster and Crabs of Atlantic Coast of the Eastern United States. Maine to Florida (Smithsonian Institution Press), pp 500. Washington D.C.

CAPÍTULO 2

Estresse salino ou térmico de curta duração não induz expressão de Hsp70 em músculo dos siris *Callinectes danae* e *Callinectes ornatus*

RESUMO

A resposta das proteínas de estresse é freqüentemente associada ao estresse térmico de ambientes aquáticos costeiros sujeitos à influência das marés. Ambientes estressantes, como o estuarino, apresentam grande variação nos fatores abióticos, particularmente da temperatura e salinidade. *Callinectes danae* e *Callinectes ornatus* são espécies eurialinas de siris com ciclos de vida distintos. *C. danae* apresenta ciclo de vida dependente da variação de salinidade, habitando estuário até o momento da reprodução, quando migram para áreas de maior profundidade e salinidade (mar aberto); o mesmo não é relatado para *C. ornatus*. Neste estudo testou-se a hipótese de que duas espécies congêneras de siris, mas com ciclos de vida ligeiramente diferentes, apresentariam diferentes respostas de expressão das proteínas de estresse (Hsp70) durante estresse térmico e salino de curta duração (2 h), simulando o que ocorreria nos ambientes de região influenciada pelas marés. Contudo, nossos resultados sugerem proteínas Hsp70 não são induzidas no músculo destes siris durante estes ciclos curtos de variação ambiental de temperatura ou salinidade.

Palavras-chaves: Estuário, hipersalino, hiposalino, estresse térmico, proteínas de estresse

Capítulo formatado para publicação na revista ***Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom***. Valéria G. Togni, Viviane Sawanoi, Silvio Zanata, Carolina A. Freire “Muscle Hsp70s are not upregulated upon short-duration saline or thermal stresses in the crabs *Callinectes danae* and *C. ornatus*”.

INTRODUÇÃO

A indução da resposta das proteínas de estresse (Hsps) tem sido, freqüentemente, utilizada como biomarcador na identificação de condições ambientais adversas em diferentes tipos de organismos. Em animais aquáticos, vários estudos têm investigado a relação entre o aumento da expressão das Hsps e a variação de fatores ambientais potencialmente estressantes, tais como temperatura (Tomanek & Sanford; Tomanek & Somero, 2000, 2002) e salinidade (Smith et al, 1999; Spees et al., 2002). O aumento dos níveis de Hsp70 e osp 54 foi observado no salmão (*Salmo salar*) submetendo-se seus tecidos (brânquias, eritrócitos e fígado) isolados a condições hiperosmóticas (Smith et al, 1999). Foi demonstrado que submeter lagostas (*Homarus americanus*) a estresse hipo e hiperosmótico de curto-prazo (30, 60 e 120 min) produz aumento significativo da expressão de Hsp70 e Hsp90 no seu músculo (Spees et al., 2002).

O ambiente estuarino é um ecossistema naturalmente estressante devido à rápida variação dos fatores abióticos, em particular da salinidade, durante o ciclo de maré (Odum, 1988). Das espécies eurialinas de braquiúros (carangueijos e siris) *Callinectes danae*, Smith, 1869 e *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 se destacam pela abundância em todo litoral sul e sudeste do Brasil (Baptista et al., 2003). O ciclo de vida de *Callinectes danae* depende da variação de salinidade, habitando estuário até o momento da reprodução quando as fêmeas ovígeras migram para áreas de maior profundidade e salinidade (mar aberto). Formas juvenis de *Callinectes ornatus* ocorrem na baía durante o ano todo, sugerindo que esta espécie aparentemente não apresenta o mesmo mecanismo de migração estuário-mar aberto observado em *Callinectes danae* (Baptista et al., 2005; Branco & Mansunari, 2000; Chacur et al., 2000; Chacur & Negreiros-Fransozo, 2001; Negreiros-Fransozo & Fransozo, 1995; Pita et al., 1985a, b).

Diferenças interespecíficas na resposta das proteínas de estresse, especialmente entre espécies congêneras, frequentemente se correlacionam positivamente com os extremos térmicos do ambiente (Tomanek & Somero, 1999, 2000, 2002). Nosso estudo prévio mostrou que *Callinectes danae* e *Callinectes ornatus* apresentam respostas distintas de modulação da atividade das enzimas antioxidantes durante o estresse oxidativo produzido pela variação de salinidade (ver CAPÍTULO 1)

Neste estudo testamos a hipótese de que duas espécies congêneras de siris, mas com ciclos de vida ligeiramente diferentes, apresentariam diferentes respostas das proteínas de estresse (Hsp70) durante estresse térmico e salino de curta duração, simulando o estresse ambiental estuarino. Não foram encontrados dados na literatura avaliando a expressão da hsp70 e a indução por estresses salino e térmico de curta duração, em animais relacionados com o ambiente estuarino.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Siris do gênero *Callinectes* (*Callinectes danae* Smith, 1869 e *Callinectes ornatus* Ordway, 1863) foram coletados junto às bancas de pescadores do Balneário de Ipanema (25°37'30"S, 48°25'08"W). Após a coleta, os animais foram acondicionados em isopor e transportados para o laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Paraná, onde permaneceram em aquário estoque contendo água do mar a 33‰ ± 2 e 24°C ± 1 durante 5 dias.

Estresse salino

Aquários com salinidades 40‰ (40 g de sal marinho para cada litro de água doce filtrada) e 10‰ (10 g de sal marinho para cada litro de água doce filtrada) foram preparados. Após aclimação os animais foram divididos em grupos: Controle: salinidade 33‰, hipersalino : permanência de 2 horas a salinidade de 40‰, retorno do hipersalino: retorno à salinidade de 33‰ por 1 hora após permanecer por 2 horas em 40‰, hiposalino: permanência de 2 horas a 10‰, retorno do hiposalino: retorno à salinidade de 33‰ por 1 hora após permanecer 2 horas em 10‰.

Estresse térmico

Após aclimação os animais foram divididos em grupos: Controle: temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 1$, estresse térmico: permanência de 2 horas a $34^{\circ}\text{C} \pm 1$, retorno do estresse térmico: retorno à temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 1$ por 1 hora após permanecer 2 horas a $34^{\circ}\text{C} \pm 1$.

Análise de Hsp70

Após terem sido submetidos às condições experimentais e controle os animais submetidos ao estresse térmico e salino foram sacrificados e fragmentos de músculo foram retirados e homogeneizados em tampão de lise, contendo HEPES (20 mM), NaCl (15mM), MgCl_2 (1,5 mM), EDTA (1mM), glicerol (10%), NP40(10%), Triton X100 (1%) e os inibidores de protease: 2-fenantrolina (1-10mM), iodoacetamida (1-10 mM), fluoreto de sulfonil fenilmetano (0,1-1mM), N-ethyl maleimida (1mM), benzamidina (10mM). Após a homogenização dos tecidos, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por cinco minutos e o *pellet* foi desprezado. A dosagem da concentração proteica presente nos extratos foi realizada utilizando-se o Azul de Coomassie G-250 (BIORAD), como descrito por Bradford (1976). Realizou-se a eletroforese para a

determinação da HSP70 em géis de poliacrilamida SDS-PAGE, aplicando-se 100mg de proteína de cada extrato em condições desnaturantes (Laemmli et al., 1970). As proteínas do gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose em câmara de Western Blotting, a 100 volts, por 1 hora. As membranas foram coradas com corante de Ponceau para confirmação da transferência. Após a retirada do Ponceau, estas foram incubadas em solução de TBST 0,05% (120mM NaCl; 20mM Tris-HCl pH 7,4; 0,05% Tween 20) contendo 10% de leite em pó à temperatura ambiente por uma hora para bloqueio de sítios não específicos. As membranas foram incubadas em sequência com o anticorpo primário monoclonal anti-Hsp70 (610607) (BD Biosciences Pharmigen, que reconhece a forma de induzida de Hsp70, foi diluído na proporção 1:1000 na solução de TBST-10% leite, por 16 horas à 4°C. Em seguida, incubava-se por 1 hora, à temperatura ambiente, o anticorpo secundário anti-mouse HRPO (horseradish peroxidase), na proporção de 1:4000. As membranas foram lavadas três vezes (cinco minutos cada) com TBST 0,05% após a adição do anticorpo primário e secundário. Utilizou-se como substrato para a enzima peroxidase acoplada ao anticorpo secundário, o luminol (SuperSignal[®] West Pico Stable Peroxide Solution) e a membrana foi incubada por 5 min. A revelação foi realizada expondo-se a membrana aos filmes (Kodak Biomax Light Film) a diferentes tempos de exposição. A densidade das bandas foi quantificada por densitometria. A comparação da densidade das bandas no diferentes tipos de tratamento foi feita através do intervalo de confiança de 95%.

RESULTADOS

Callinectes danae submetidos ao estresse hipersalino (**Fig. 2.1A**), retorno do hipersalino (**Fig. 2.1B**), hiposalino (**Fig. 2.1C**) e retorno do hiposalino (**Fig. 2.1D**) não apresentaram alterações na expressão de Hsp70 muscular quando comparados aos seus respectivos controles. Também não houve diferença da expressão de Hsp70 em músculo de *C. danae* submetidos ao estresse térmico e os animais do grupo controle (**Fig. 2.1E**). Não houve alteração significativa da expressão de Hsp70 no tecido muscular de *Callinectes ornatus* dos grupos hipersalino (**Fig. 2.2A**), retorno do hipersalino (**Fig. 2.2B**), hiposalino (**Fig. 2.2C**) e retorno do hiposalino (**Fig. 2.2D**) quando comparados aos seus respectivos controles. O estresse térmico de 2 horas também não induziu a expressão de Hsp70 no tecido muscular de *C. ornatus* (**Fig. 2.2E**).

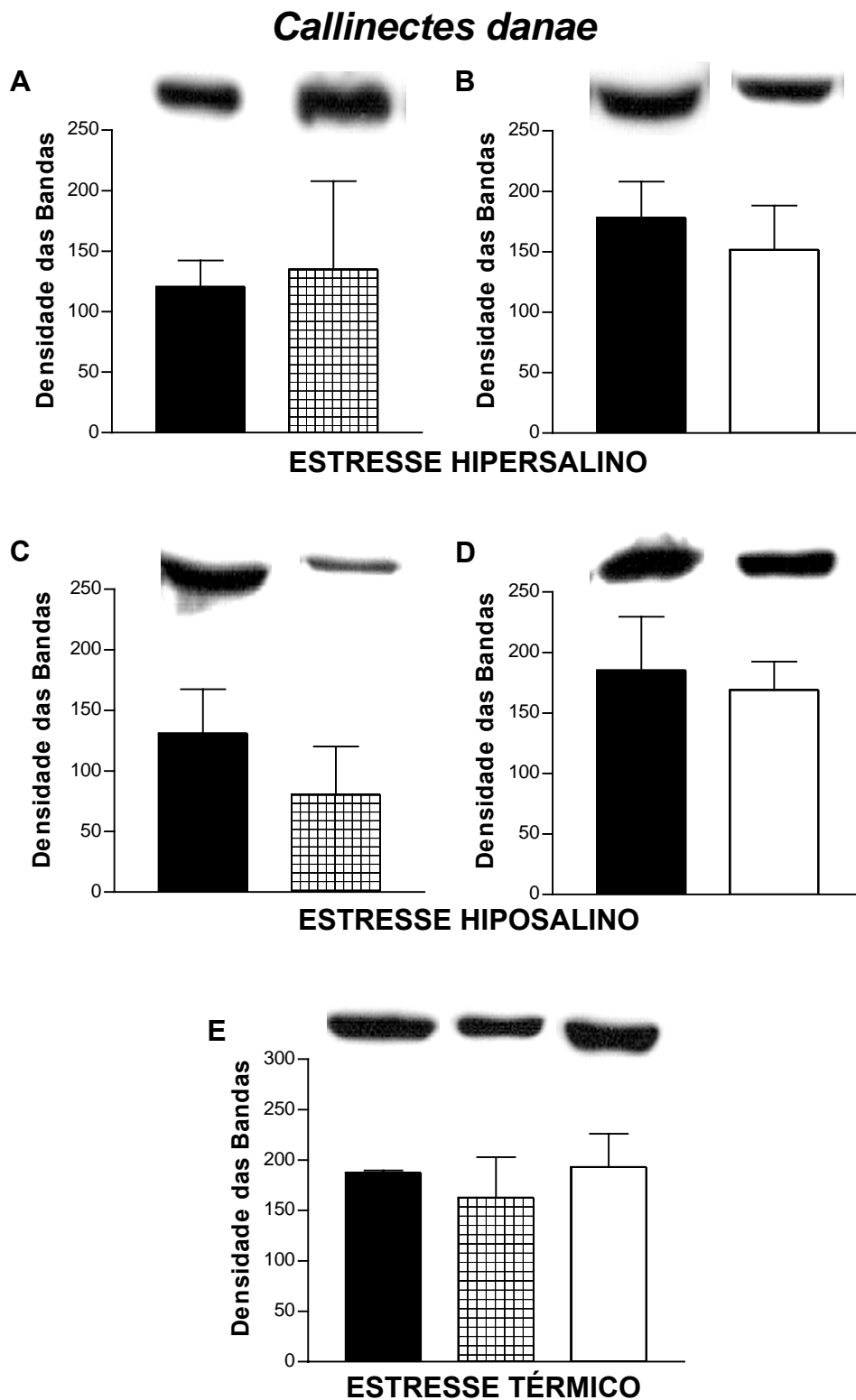


Figura 2.1: Densidade das bandas de Hsp70 expressa no músculo de *Callinectes danae* após 2 horas de estresse salino ou térmico (barras quadriculadas). Para cada situação experimental correram-se amostras dos animais controles (barras pretas). O grupo de retorno das condições de estresse é representado pelas barras brancas. (A) estresse hipersalino, (B) retorno do hipersalino, (C) estresse hiposalino, (D) retorno do hiposalino, (E) estresse térmico e retorno do estresse térmico. Estão representados os valores da média da densidade das bandas \pm intervalo de confiança de 95% de 5 animais em cada grupo. Acima de cada barra gráfica estão apresentadas amostras representativas dos resultados do *western blotting*.

Callinectes ornatus

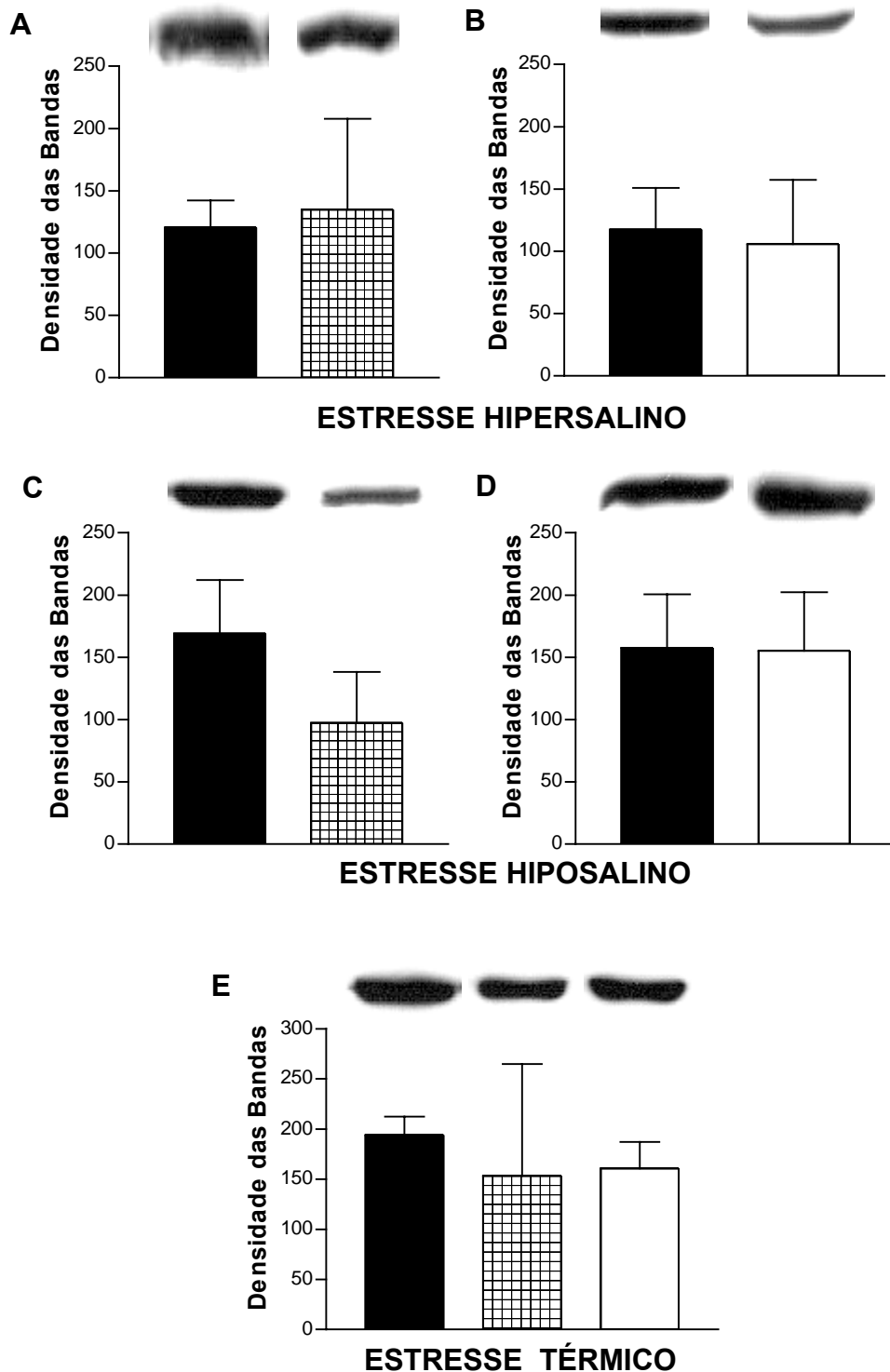


Figura 2.2: Densidade das bandas de Hsp70 expressa no músculo de *Callinectes ornatus* após 2 horas de estresse salino ou térmico (barras quadriculadas). Para cada situação experimental correram-se amostras dos animais controles (barras pretas). O grupo de retorno das condições de estresse é representado pelas barras brancas. (A) estresse hipersalino, (B) retorno do hipersalino, (C) estresse hiposalino, (D) retorno do hiposalino, (E) estresse térmico e retorno do estresse térmico. Estão representados os valores da média da densidade das bandas \pm intervalo de confiança de 95% de 5 animais em cada grupo. Acima de cada barra gráfica estão apresentadas amostras representativas dos resultados do *western blotting*.

DISCUSSÃO

A influência do ambiente sobre a expressão das proteínas de estresse têm sido evidenciada em diversas espécies de peixes (Feder & Hofmann, 1999; Smith et al., 1999) e invertebrados marinhos (Hofmann & Somero, 1995; Tomanek & Somero, 2000, 2002; Tomanek & Somero, 2003; Wener, 2004), o que faz dessas proteínas, principalmente Hsp70, importante biomarcador do estresse ambiental (Yenari et al., 1999). A temperatura e a salinidade são fatores ambientais bastante variáveis em animais estuarinos e influenciam diretamente vários processos fisiológicos, tais como a reprodução (Baptista et al., 2003, 2005; Chacur et al., 2000; Odum, 1988).

Callinectes danae e *Callinectes ornatus* são espécies congênericas de siris bastante tolerantes à variação de salinidade que ocorre no estuário, mas que apresentam ciclos de vida distintos. *C. danae* habita regiões de grande flutuação de salinidade (estuário) durante a fase juvenil até a fase adulta e para a desova e incubação dos ovos necessita de ambiente de salinidade estável (baía) (Chacur et al., 2000; Paul, 1982 apud Chacur et al., 2000), o que aparentemente não ocorre durante o desenvolvimento de *C. ornatus* (Negreiros-Fransozo & Fransozo, 1995). Assim, a grande diferença entre as duas espécies consiste no fato de que *C. danae* necessita da variação de salinidade para completar seu ciclo de vida, enquanto *C. ornatus* tolera variações de salinidade, contudo não depende destas para seu ciclo de vida.

Nosso estudo anterior confirmou que estas duas espécies de siris são bastante eurihalinas, tolerando o estresse salino apresentado. Além disso, asseguram sua homeostasia osmótica extracelular quando expostas a meio hiper-salino, porém permitem certa diluição da sua hemolinfa quando expostas a meio hiposalino (ver CAPÍTULO 1, **Fig. 1.1**). O aumento da salinidade por 2 horas induziu mecanismos distintos de modulação da atividade das enzimas antioxidantes em *C. danae* e *C. ornatus* (ver CAPÍTULO 1) contudo, a mesma variação de salinidade não induziu o

aumento de expressão de Hsp70 nestes animais (**Fig. 2.1A e 2.2A**). Em moluscos marinhos (*Potamocorbula amurensis*), a capacidade de aumentar os níveis de Hsp70 após choque térmico de 30 min foi prejudicada pela baixa de salinidade, devido ao alto consumo de energia ocasionado pelo aumento da necessidade de osmorregulação (Werner, 2004). De fato, grande quantidade de energia parece ser necessária não somente para a síntese das proteínas de estresse como também para sua função (Roberts et al., 1997). Foi demonstrado que *C. danae* e *C. ornatus* são eficientes osmorreguladores (ver CAPÍTULO 1) sendo assim, nossos resultados corroboram a hipótese de que a síntese de Hsp70, após poucas horas de estresse pode ter sido prejudicada pela menor disponibilidade de energia devido ao gasto com a osmorregulação nestes animais. Adicionalmente, a ausência de indução da expressão de Hsp70 observada aqui é compatível com o fato de que em células adaptadas ao estresse osmótico, como as células da medula renal de mamíferos, o aumento abrupto da osmolalidade não aumentou os níveis de Hsp70, somente o aumento gradual da osmolalidade (durante 20 horas) foi capaz de induzir a resposta das proteínas de estresse (Cai et al., 2003). De forma compatível, o aumento da expressão de hsp70 em músculo da lagosta *Homarus americanus* submetida a alteração de salinidade por tempos curtos (Spees et al., 2002) pode se relacionar com o fato de esta lagosta marinha, apesar de migrar para o estuário para desovar, sua fase adulta é considerada osmorreguladora fraca, diferente dos siris *Callinectes*. Invertebrados osmoconformadores ou osmorreguladores fracos não gastam energia para manter a homeostasia do seu meio extracelular. Suas células enfrentam as variações abruptas no seu ambiente (meio extracelular) e realizam então regulação de volume (ou regulação isosmótica intracelular) (Péqueux, 1995). Pode de fato ser razoável supor que células musculares de osmorreguladores (como *C. danae* e *C. ornatus*) tenham mecanismos e cursos temporais diferentes para indução da expressão de proteínas de

estresse diante de estresse salino do que osmorreguladores fracos como a lagosta marinha *Homarus americanus*.

O estresse térmico a que as duas espécies de siris foram submetidas em laboratório também não induziu o aumento dos níveis de Hsp70 em ambas as espécies de siris (**Fig 2.1E e 2.2E**), tal como o estresse salino. A indução da resposta de Hsp70 em caranguejos estuarinos (*Chasmagnathus granulatus*), com o mesmo anticorpo utilizado aqui (610607-BD Biosciences Pharmigen), que reconhece a forma de induzida de Hsp70, não ocorre após 24 h de exposição a aumento de 3 °C na temperatura, mas ocorre somente após vários dias (8 dias) de elevação de temperatura (6 °C) (A. Bianchini, comunicação pessoal). Deve-se ressaltar que em moluscos de entre-marés (*Tegula*), foi observada indução de várias classes de Hsps (70, 77, 90, 38 kDa) após 2-14 horas de estresse térmico (Tomanek & Somero, 2000). Por outro lado, o padrão de resposta da expressão destas proteínas muitas vezes envolve aclimações de longo-prazo (e.g., 30-34 dias, Tomanek & Somero, 2002) para evidenciar diferenças inter-específicas. De qualquer forma, a abordagem utilizada aqui necessitaria da utilização complementar de outras metodologias de detecção e quantificação da indução das Hsp70 para que se pudesse de fato concluir sobre a não indução rápida destas proteínas de estresse nestes siris diante de estresse salino ou térmico de curto-prazo.

Verificou-se assim que a elevação da temperatura ou variação de salinidade por curto período de tempo, à semelhança do que ocorreria em regiões afetadas pelo ciclo de marés na natureza (estuário), não induziu a síntese de Hsp70 nas duas espécies de siris. Este tipo de estresse salino afeta o sistema antioxidante (ver CAPÍTULO 1), principalmente em *C. ornatus*, que tem menor atividade constitutiva das enzimas antioxidantes, porém é insuficiente para induzir a expressão de Hsp70. Estudos adicionais são obviamente necessários para esclarecer o padrão de resposta das

diversas proteínas de estresse diante de estresse ambiental de curta duração em regiões sob influência de marés em estuários, em espécies adaptadas a estas flutuações ambientais rápidas.

REFERÊNCIAS

- Baptista, C.; Pinheiro, M. A. A.; Blankensteyn, A & Borzone, C. A., 2003 Estrutura populacional de *Callinectes ornatus* Ordway (Crustacea, Portunidae) no Balneário de Shangri-lá, Pontal do Paraná, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, **20**, 661-666.
- Baptista-Metri, C.; Pinheiro, M. A. A.; Blankensteyn, A. & Borzone, C. A., 2005. Biologia populacional de *Callinectes danae* Smith (Crustacea, Portunidae), no Balneário de Shangri-lá, Pontal do Paraná, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, **22**, 446-453.
- Bradford, M., 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye-Bonding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- Branco, J. O. & Mansunari, S., 2000. Reproductive ecology of blue crab, *Callinectes danae* Smith, 1869 in the conceição lagoon system, Santa Catarina Isle, Brazil. *Revista Brasileira de Biologia*, **60**, 17-27.
- Chacur, M. M. & Negreiros-Fransozo, M. L., 2001. Spatial and seasonal distribution of *Callinectes danae* (Decapoda, Portunidae) in Ubatuba Bay, São Paulo, Brazil. *Journal of Crustacean Biology*, **21**, 414-425.
- Chacur, M. M.; Mansur, C. B. & Negreiros-Fransozo, M. L., 2000. Distribution patterns, seasonal abundance and moult cycle of *Callinectes danae* Smith, 1869 in Ubatuba region, Brazil. *Nauplius*, **8**, 215-226.
- Cai, Q. I.; Ferraris, J. D. & Burg, M. B., 2003. Greater tolerance of renal medullary cells for a slow increase in osmolality is associated with enhanced expression of HSP70 and other osmoprotective genes. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, **286**, 58-67.
- Feder, E. M. & Hofmann, G. E., 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology*, **61**, 243-282.
- Feder, E. M.; Parsell, A. D. & Lindquist, S., 1995. The stress response and stress proteins. In: *Cell Biology of Trauma* (ed. J. J. Lemasters and C. Oliver), pp. 177-191. CRC Press. Boca Raton.

- Hofmann, G. E. & Somero, G. N., 1995. Evidence for protein damage at environmental temperatures: seasonal changes in levels of ubiquitin conjugates and hsp70 in the intertidal mussel *Mytilus trossulus*. *The Journal of Experimental Biology*, **198**, 1509-1518.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Negreiros-Fransozo, M. L. & Fransozo, A., 1995. On the distribution of *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 and *Callinectes danae* Smith, 1869 (Brachyura, Portunidae) in the Fortaleza Bay, Ubatuba, Brazil. *Iheringia, Série Zoologia*, **79**, 3-12.
- Odum, E.P., 1988. *Ecologia*, 2nd edn. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro.
- Paul, R. K. G., 1982. Observations on the ecology and distribution of swimming crabs on the genus *Callinectes* (Decapoda, Brachyura, Portunidae) in the Gulf of California, Mexico. *Crustaceana*, **42**, 96-100.
- Péqueux, A., 1995. Osmotic regulation in Crustacea. *Journal of Crustacean Biology*, **15**, 1-60.
- Pita, J. B.; Rodrigues, E. S.; Graça Lopes, R. & Coelho, J. A. P., 1985a. Levantamento preliminar da Família Portunidae (Crustacea, Decapoda, Brachyura) no complexo Baía estuário de Santos, São Paulo, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, **12**, 153-162.
- Pita, J. B.; Rodrigues, E. S.; Graça Lopes, R. & Coelho, J. A. P., 1985b. Observações bioecológicas sobre o siri *Callinectes danae* Smith, 1869 (Crustacea, Portunidae) no complexo Baía estuário de Santos, Estado de São Paulo, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, **12**, 35-43.
- Roberts, D. A.; Hofmann, G. E. & Somero, G. N., 1997. Heat-shock protein expression in *Mytilus californianus*: Acclimatization (seasonal and tidal-height comparisons) and acclimation effects. *The Biological Bulletin*, **192**, 309-320.
- Smith, T. R.; Tremblay, G. C. & Bradley, T. M., 1999. Hsp70 and a 54 kDa protein (Osp54) are induced in salmon (*Salmo salar*) in response to hyperosmotic stress. *Journal of Experimental Zoology*, **284**, 286-298.
- Spees, J. L.; Chang, S. A.; Snyder, M. J. & Chang, E. S., 2002. Osmotic induction of stress-responsive gene expression in the lobster *Homarus americanus*. *The Biological Bulletin*, **203**, 331-337.
- Tomanek, L. & Sanford, E., 2003. Heat-shock protein 70 (Hsp70) as a biochemical stress indicator: an experimental field test in two congeneric intertidal gastropode (Genus: *Tegula*). *The Biological Bulletin*, **205**, 276-284.
- Tomanek, L. & Somero, G. N., 2000. Time course and magnitude of synthesis of heat-shock protein in congeneric marine snails (Genus *Tegula*) from different tidal heights. *Physiological and Biochemical Zoology*, **73**, 249-256.

- Tomanek, L. & Somero, G. N., 2002. Interspecific- and acclimation- induced variation in levels of heat-shock proteins 70 (hsp70) and 90 (hsp90) and heat-shock transcription factor-1 (HSF1) in congeneric marine snails (genus tegula): implications for regulation of hsp gene expression. *The Journal of Experimental Biology*, **205**, 677-685.
- Werner, I., 2004. The influence of salinity on the heat-shock protein response of *Potamocorbula amurensis* (Bivalvia). *Marine Environmental Research*, **58**, 803-807
- Yenari, M. A.; Giffard, G. R. G.; Sapolsky, R. M. & Steinberg, G. K., 1999. The neuroprotective potential of heat shock protein 70 (HSP70). *Molecular Medicine Today*, **5**, 525-31.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados deste estudo mostraram que o aumento da salinidade foi importante indutor da atividade das enzimas antioxidantes (GPX e catalase) e que as duas espécies congênicas de siris, mas com ciclos de vida diferentes em relação à ocupação do ambiente variável dos estuários, apresentaram mecanismos distintos de modulação da atividade destas enzimas durante o estresse de oxigênio e o estresse salino de curta duração, simulando potencialmente o estresse ambiental em ambiente sob influência das marés. Frente ao estresse hipersalino, *Callinectes ornatus* aumenta a atividade de catalase e GPX, contudo não foi suficiente para evitar danos oxidativos a lipídios. Por outro lado, *Callinectes danae* apresentou manutenção de alta atividade constitutiva destas enzimas antioxidantes como mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo minimizando danos oxidativos a lipídios e proteínas.

Verificou-se ainda que a elevação da temperatura ou variação de salinidade, por curto período de tempo, à semelhança do que ocorreria em regiões afetadas pelo ciclo de marés na natureza, não induziu a síntese de Hsp70 no músculo das duas espécies de siris. Concluindo, a variação de salinidade por tempo curto foi capaz de induzir ao estresse oxidativo e a resposta do sistema antioxidante, porém foi insuficiente para induzir a resposta das proteínas de estresse (Hsp70).